ES.A7

Ano 1943

Tomo 38

Fascículo 2

# MEMÓRIAS
## DO
# INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Rio de Janeiro - Brasil

IMPRENSA NACIONAL
RIO DE JANEIRO — 1943

# ÍNDICE

**Tomo 38 — Ano 1943 — Fasciculo 2**


AZEVEDO, A. PENNA DE e CARDOSO, RITA A. DE ALMEIDA — Carcinoma primário do pulmão ..... 101

SOUZA-LOPES, H. DE — Contribuição ao conhecimento das larvas dos *Sarcophagidae* com especial referência ao esqueleto cefálico (*Diptera*) .... 127

DIAS, EMMANUEL e TORRICO, RAFAEL A. — Estudos preliminares sobre a Doença de Chagas na Bolivia ..... 165

VILLELA, GILBERTO G. — Um novo "test" ponderal para a avaliação da atividade do hormônio cortical ..... 173

DIAS, EMMANUEL — Presença de *Panstrongylus megistus* infectado por *Schizotrypanum* no Rio de Janeiro, Distrito Federal ..... 177

SEABRA, C. A. C. e HATHAWAY, C. R. — Sobre uma variedade de *Spiniger flavofasciatus* Stall, 1859 ..... 181

SOUZA-ARAUJO, H. C. DE — Infecção experimental de carrapatos (*Amblyomma cajennense*) em ratos com lepra Stefansky ..... 183

LINHARES, HERMINIO — Transmissão de imunidade antiamarilica da mãe aos filhos, em camondongos ..... 187

LINHARES, HERMINIO — Inoculação de virus amarílico em gatos jovens..... 201

LINHARES, HERMINIO — Suscetibilidade de camondongos ao virus amarílico administrado por vias extraneurais ..... 209

LINHARES, HERMINIO — Suscetibilidade de pintos ao virus amarílico neurotrópico. ..... 225


---


As **MEMÓRIAS,** orgão oficial do Instituto Oswaldo Cruz, editadas sob a direção do Dr. H. C. de Souza-Araujo, são reservadas, exclusivamente, à publicação de trabalhos nele realizados, e aparecerão em fascículos em Março, Junho, Setembro e Dezembro.

Toda a correspondência deverá ser dirigida à:

REDAÇÃO DAS MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
CAIXA POSTAL 926 — ENDEREÇO TELEGRÁFICO: "MANGUINHOS", RIO
RIO DE JANEIRO — BRASIL

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 38 Ano — 1943 Fascículo 2

# Carcinoma primário do pulmão (*)

pelos doutores

A. Penna de Azevedo e Rita A. de Almeida Cardoso

(Com 8 figuras e 2 gráficos no texto)

O carcinoma primário do pulmão vem constituindo importante assunto na literatura médica atual, conforme se depreende da leitura das numerosas publicações. O maior interesse tem despertado a sua frequência, a sua sistematização histológica e as possiveis causas de sua origem, além da questão geral, ligada à própria essência do cancer.

Muito ao contrário do conceito antigo que considerou o cancer do pulmão uma condição rara, os estudos modernos teem demonstrado que é o pulmão um dos principais orgãos de localização primária de blastomas malignos.

Em algumas estatísticas modernas, verifica-se que o pulmão ocupa o terceiro ou mesmo o segundo lugar entre os tecidos que habitualmente dão origem ao cancer. BRINES e KENNING, tomando por base o material necroscópico de que dispunham, colocam o pulmão em segundo lugar. Na estatística de KLOTZ, em um período de 10 anos, terminando em 1936, o carcinoma pulmonar ocupa o terceiro lugar (17 %) entre os tumores malignos epiteliais, observados em necrópsias, sendo precedido apenas pelos tumores do grosso intestino e os do estômago. De modo geral, verifica-se que a incidência do cancer do pulmão varia de 1 a 4 % entre o total das necrópsias (3,7 % segundo SIMPSON; 1,17 % segundo KLOTZ).

* Recebido para publicação a 14 de janeiro e dado à publicidade em abril de 1943.

Tem-se procurado explicar o possivel aumento da incidência do carcinoma do pulmão, invocando vários fatos como argumentos, devendo-se em primeiro lugar considerar o emprego, nos hábitos comuns da vida atual, de veículos a motor que facilitam na combustão, a elaboração de substâncias de poder cancerigênico conhecido, tais os derivados da pirogenação da hulha e do petróleo, alem das matérias usadas geralmente na pavimentação de ruas e estradas de rodagem. Os produtos de combustão e as poeiras das estradas, lançados ao ar ambiente, são inalados e atingem o pulmão, aonde podem sofrer grande concentração. Alguns autores julgam apenas aparente tal aumento, considerando que alguns fatos vieram influir decisivamente no sentido de se poder melhor conhecer a condição mórbida. Entre esses fatos, referem o aperfeiçoamento dos meios usados para diagósticos, tais o auxílio dos raios X, da broncoscopia e da biopsia, bem como o aumento da média da idade do homem nos nossos dias, calculada da época de TUT-ANHK-AMEM até o descobrimento da América em 18 anos; na época da guerra civil da América do Norte, em 45 anos e hoje, em cerca de 57 anos. (THOMAS). De qualquer modo, entretanto, deve-se admitir que o cancer pulmonar é comum. Na opinião de muitos autores, a asserção de que há aumento real do carcinoma do pulmão, é baseada na incidência do tumor em material que durante longo tempo foi estudado sob a mesma orientação.

Como prova do melhor aparelhamento para o conhecimento disgnóstico do carcinoma do pulmão, basta citar a melhoria da percentagem dos diagnósticos clínicos modernos. Na série de casos de WELLER (1913) o diagnóstico está certo em 11 % dos casos; na série de SCOTT e FORMAN (1916) nenhum caso poude ser diagnósticado; no material de BRINES e KENNING (1937), atingiu a 73 % a confirmação do diagnóstico clínico.

Contudo um dos maiores fatores que esclareceram a natureza do processo, foram as novas conquistas obtidas no campo da histologia. À medida que se tornou possivel identificar com segurança, a composição citológica das várias estruturas do aparelho respiratório, particularmente dos brônquios, estabeleceu-se o conceito exato para o diagnóstico do carcinoma do pulmão.

Por esse motivo, os sarcomas do pulmão, considerados tumores frequentes, passaram a ser reconhecidos como tumores muito raros, em virtude de, por técnicas especiais e pela morfologia peculiar, se poder identificar como epitelial a célula antes considerada sarcomatosa. Os estudos de BARNARD (1926) e mais tarde, os de BOYD, muito contribuiram para estabelecer as principais bases macroscópicas e microscópicas do carcinoma do pulmão.

Em referência às causas produtoras do tumor, os estudos modernos teem sido numerosos, procurando estabelecer uma possivel relação entre a sua maior incidência e a atuação de certos fatores, particularmente de natureza

Fig. 1 — Carcinoma infiltrante hilar do pulmão, observando-se o tumor do brônquio e as metástases em ambos os pulmões. A. 6.626. (Foto de J. Pinto).

química e física, atuando direta ou indiretamente pelas condições habituais da vida ou através do ar inalado.

Assim tem sido invocada a atuação de fatores tais os traumatismos agudos, os agentes bacterianos, físicos e químicos. A ação dos traumatismos, alem de muito discutida, não tem encontrado elementos sólidos de apoio, a não ser no caso de WELLS e CANNON.

A possivel influência de agentes bacterianos tem sido observada em relação com a influenza, sífilis, processos crônicos inespecíficos acompanhados de bronquietasia e particularmente a tuberculose, cuja associação ao cancer pulmonar é frequente. A ação dos agentes físicos e químicos tem preocupado mais interessadamente aos pesquisadores. Nessas condições, devem ser lembradas as particularidades relacionadas com o cancer do pulmão dos indíviduos expostos a poeiras determinadas, as quais inaladas e concentradas eficientemente no pulmão seriam o ponto de partida para a formação do cancer. Mc. NALLY assevera que a nicotina, os corpos fenólicos, as bases piridínicas e a amônia provenientes do tabaco são irritantes capazes de produzir a tosse dos fumantes, bronquites crônicas, leucoplasia e aumento do cancer pulmonar. KENNAWAY e KENNAWAY procuravam demonstrar que é entre os operários expostos às poeiras das estradas alcatroadas que ocorre a maior incidência do cancer pulmonar, mais elevada mesmo do que entre os expostos à inalação de produtos derivados da hulha, alcatrão e tabaco.

A elevada incidência e o aspecto peculiar do cancer pulmonar entre os operários de certas minas, principalmente as de JOACHMISTAL e de SCHEEBERG teem despertado particular interesse. Nessas minas em que se trabalha com minérios contendo cobalto, arsênico, bismuto e niquel, em alta percentagem é encontrado o carcinoma do pulmão entre os mineiros, que são acometidos eventualmente entre 50-70 %. Embora sejam radioativas as poeiras de tais minas, contudo nas lesões pulmonares não se evidencia a rádio atividade, bem como a presença de qualquer produto químico. As mesmas poeiras por sua vez, são incapazes de determinar o cancer pulmonar em camondongos a elas expostos.

Os estudos realizados procurando estabelecer uma possivel origem hereditária do cancer do pulmão não forneceram resultados elucidadores.

Sobre a influência da raça e do clima, pouco se pode concluir, embora seja verificada a maior frequência em indivíduos de raça branca.

Mais comumente são atingidos individuos do sexo masculino, na proporção de 2:1 ou mesmo de 4:1, geralmente entre os 40 e 70 anos, com o máximo entre 50 e 60, embora se encontrem casos com idades extremas.

As estatísticas demonstram ainda que a ocupação profissional pode ser um dos fatores que facilitam o aparecimento do cancer pulmonar, verifican-

do-se a maior incidência em indivíduos expostos a poeiras industriais. BROCKBANK encontrou em 62 casos, 14,5 % em indivíduos laborando em poeiras comerciais e 29 % expostos a fumaças. Nos casos de ROSEDALE e Mc KAY, 75 % tinham estado expostos a poeiras. Contudo admite-se que ainda nesse sentido, os resultados gerais são desapontadores, pois FRISSELL e KNOX acharam apenas 3 vezes em 46 casos. (KLOTZ).

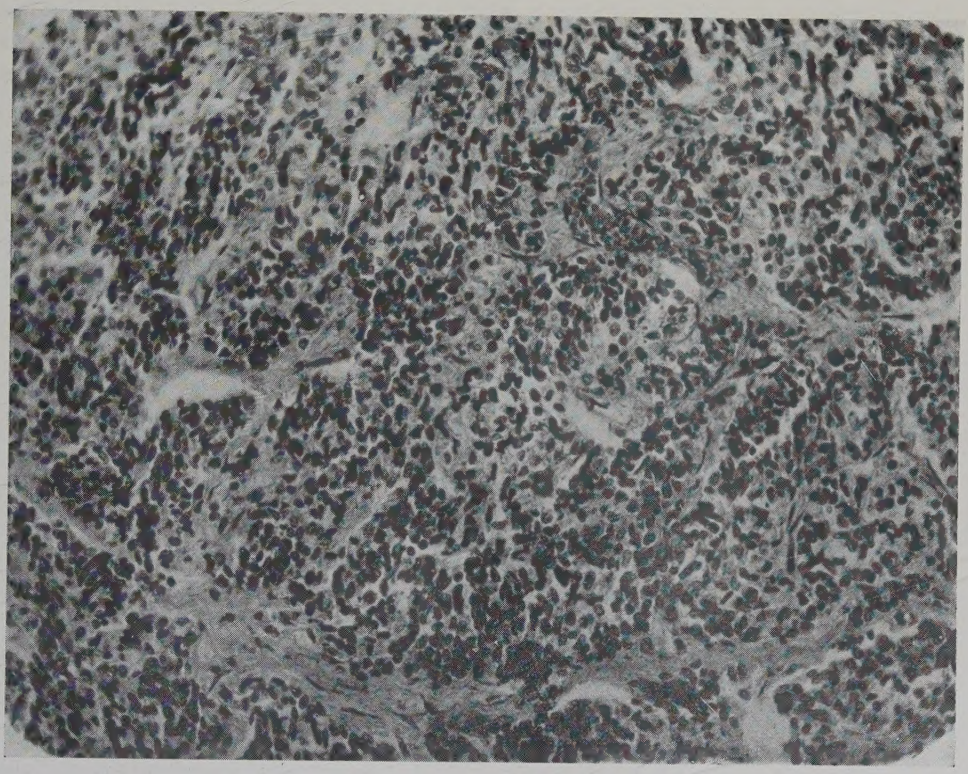


Fig. 2 — Carcinoma de células indiferenciadas, com predominância de células basais. Corte de pulmão. A. 3.992.

O carcinoma do pulmão manifesta-se geralmente sob a forma infiltrante, constituindo cerca de 90 % de todos os tumores do brônquio. A forma nodular em comparação é muito rara, quer sob a forma de massas pequenas, limitadas, distribuidas pelo parênquima pulmonar como se fossem tumores metastáticos, quer sob a forma de nódulo isolado, único, ainda mais rara. A forma difusa, alem de rara, não é admitida por todos, podendo ainda ser considerada como forma derivada das anteriores, confundindo-se com a consolidação pulmonar ou a fibrose intersticial.

O conhecimento exato da constituição citológica da mucosa brônquica e da sua capacidade metaplásica é o fato de maior relevância para o estudo sistemático do carcinoma pulmonar.

O carcinoma pulmonar provem habitualmente, das células da mucosa brônquica e das glândulas brônquicas. A possivel origem a custa das células do revestimento alveolar ainda não encontra apoio em bases seguras para a sua adoção. As células constituintes do carcinoma pulmonar podem oferecer aspectos peculiares que permitem estabelecer um grupo de tumores de células indiferenciadas ou tumores anaplásicos, representados por células do tipo basal e do tipo intermediário, e outro grupo formado pelos tumores de células diferenciadas, representado por células do tipo pavimentoso (carcinoma epidermoide) ou do tipo cilíndrico (adenocarcinoma). Acontece, porem, que muitas vezes, o tumor se encontra em fases de trasição metaplásica de suas células e observa-se então, que o mesmo tumor apresenta aspectos estruturais diferentes, observados em vários orgãos, no próprio tumor e até mesmo em um só corte histológico. Em tais condições, é possivel surpreender no mesmo tumor, aspectos pleomórficos, representados por hiperplasias de tipo glandular, epidermoide e pseudo-sarcomatoso.

WELLER representa graficamente os tumores do pulmão, de acordo com a sua diferenciação histológica, por um Y em que os tumores de células indiferenciadas ocupam o ramo principal, enquanto os ramos superiores representam, um o tipo epidermoide e o outro, o cilíndrico, a situação nos ramos, obedecendo ao critério da diferenciação célular progressiva.

A capacidade metastática do carcinoma do pulmão é grande, embora não seja a mesma para cada um dos tipos hitológicos. Geralmente, observam-se metàstases, fora de mediastino, e em ordem decrescente, nos gânglios linfáticos cervicais, fígado, gânglios linfáticos abdominais, rins, suprarrenal, osso, cérebro, pâncreas, tireóide.

De acordo com a estrutura do tumor, observa-se que o tipo cilíndrico (adenocarcinoma) com frequência fornece metástases ao sistema nervoso central, suprarrenais, rins, pulmões, fígado e osso, usando para a sua propagação geralmente a via sanguínea; o tipo pavimentoso (carcinoma epidermóide) tem menor capacidade metastática, restringindo-se à infiltração local dos tecidos e dos gânglios linfáticos brônquicos; o tipo indiferenciado mostra extensa generalização linfogênica, associando-se ao comprometimento do pâncreas, fígado e baço. (SAMPSON).

## MATERIAL

Desejando estudar e dar a conhecer os vários aspectos apresentados pelo carcinoma primário do pulmão, recorremos ao material que existe arquivado

na Secção de Anatomia Patológica do Instituto Oswaldo Cruz, constituido por casos de necrópsias realizadas pelos seus técnicos em vários hospitais do Rio de Janeiro, em período que medeia de 1919 a 1941.

O material assim colecionado, sofreu meticuloso exame histológico, em vários cortes do tumor originário e nos tecidos com metástases, usando-se as técnicas habituais de coloração ou, quando necessárias, técnicas especiais.

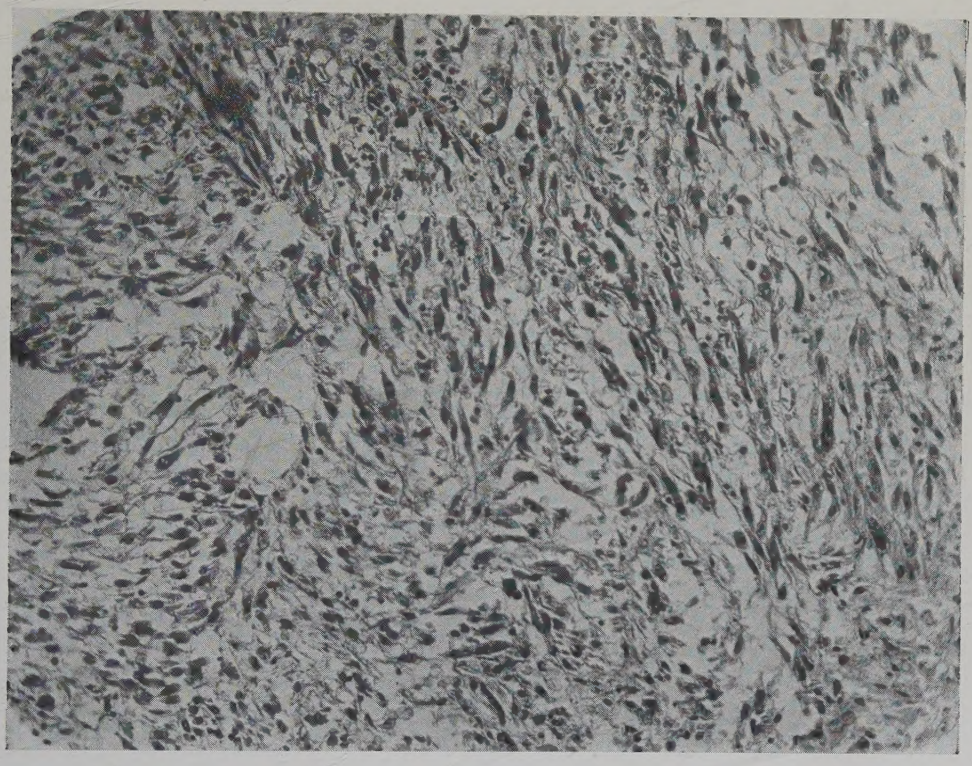


Fig. 3 — Carcinoma de células indiferenciadas, predominando as células de tipo fusiforme. (Forma pseudosarcomatosa: "oat-celled sarcoma"). Corte de pulmão. A. 3.992.

Por serem incompletos alguns esclarecimentos fornecidos, deixamos de examinar certas questões que, relacionadas ao cancer pulmonar, poderiam oferecer conclusões interessantes relativas à profissão e à evolução da doença.

*Material*:

Caso n. 1 — A. 1.200 — Dr. d'Utra e Silva — 28-8-1919.

M. O., sexo masculino, 21 anos brasileiro, branco.

Pequenos nódulos à superfície do corte, em ambos os pulmões (lobos superiores) e na pleura, onde atingem o volume de uma ervilha. Bronquios livres. Nódulos metastáticos no fígado, e gânglios linfáticos peripancreáticos. Exame microscópico: os

nódulos, por vezes necrosados, são constituidos por células cilíndricas, anaplásicas, esboçando ocasionalmente, a estrutura alveolar. Aspecto semelhante é encontrado nas metástases.

Diagnóstico : Carcinoma nodular de células cilíndricas, com metástases no fígado e gânglios linfáticos peripancreáticos.

Caso n. 2 — A. 1.487 — Dr. C. Burle de Figueiredo — 12-1-1921.

A. J. M., sexo masculino, 32 anos, português, branco.

Nódulos do tamanho de uma uva, de cor amarela, superfície lisa, duros, distribuidos por todo o parenquima pulmonar. Brônquios livres. Nódulos metastáticos no fígado; trombose blastomatosa da veia porta. Exame microscópico : o tumor apresenta a estrutura de carcinoma de células cilíndricas, dispostas frequentemente em cordões e áreas celulares densas, às vezes com a parte central necrosada e ocasionalmente, reproduzindo aspecto acinoso. A mesma estrutura observa-se nas metástases.

Diagnóstico : Carcinoma nodular de células cilíndricas (adeno-carcinoma) com metástases no fígado.

Caso n. 3 — A. 1.508 — Dr. C. Magarinos Torres — 26-7-1926.

I. A. P., sexo masculino, 52 anos, português, branco, sapateiro.

No ponto de terminação do brônquio esquerdo, existe uma cavidade de 6x7 cm., na espessura do lobo inferior, apresentando nas vizinhanças, massas de tecido estranho. Metástases são encontradas nos gânglios linfáticos peribrônquicos. Exame microscópico : o tumor é constituido por células pavimentosas, diferenciadas, com formação de pérolas epiteliais. A mesma estrutura é observada nas metástases gangliais.

Diagnóstico : Carcinoma infiltrante hilar de células pavimentosas (carcinoma epidermoide) com metástases nos gânglios linfáticos peribrônquicos.

Caso n. 4 — A. 1.695 — Dr. Cesar Guerreiro — 13-10-1921.

M. A. O., masculino, português, branco.

No mediastino anterior, existe formação blastomatosa, medindo 12x8x6, 5 cm., em relação com o brônquio direito e outros nódulos blastomatosos do tecido pulmonar, nas vizinhanças do brônquio direito, restringindo a luz da traquéia, os quais igualmente se encontram em continuidade com o tecido blastomatoso que circunda o brônqui. Metástases na traquéia, pleura esquerda, pericárdio, fígado e gânglios linfáticos cervicais, mediastínicos anteriores e inguino-crurais.

Exame microscópico : O tumor é constituido por células cilíndricas, em formação alveolar, não chegando a reproduzir a estrutura acinosa.

Diagnóstico : Carcinoma infiltrante hilar de células cilíndricas, com metástases nos gânglios linfáticos mediastínicos anteriores, cervicais e inguino-crurais, no fígado, pleura esquerda e pericárdio.

Caso n. 5 — A. 2.737 — Dr. Eudoro Villela — 20-8-1935.

J. A., sexo feminino, 61 anos, nacionalidade brasileira, côr preta, doméstica.

Nódulos de cor amarela esbranquiçada, no pulmão esquerdo; metástases nos gânglios linfáticos do hilo do pulmão esquerdo e fígado.

Exame microscópico: O tumor é constituido por células do tipo pavimentoso, bastante anaplásicas, com tendência a queratinização, formando, em pequeno número, pérolas epiteliais, mas não apresentando diferenciação espicular.

O tumor apresenta extensas áreas de necrose. A mesma estrutura observa-se nas metástases.

Diagnóstico: Carcinoma nodular de células pavimentosas (carcinoma epidermoide), com metástases nos gânglios linfáticos e fígado.

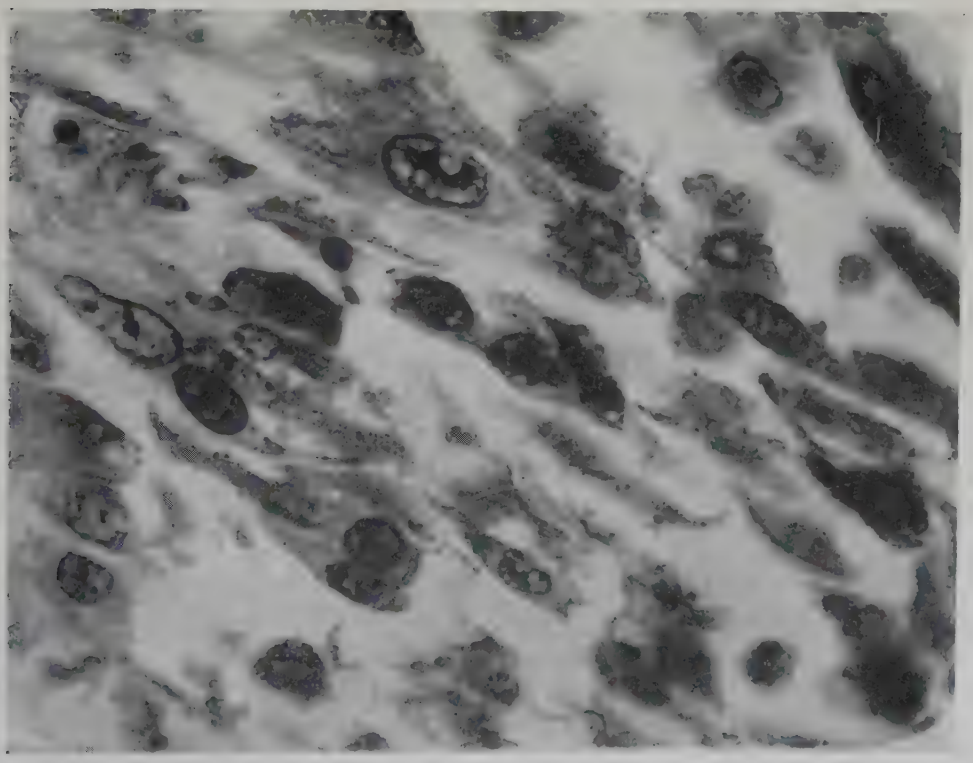


Fig. 4 — Carcinoma de células indiferenciadas. As células são aptípicas e embora fusiformes, já possuem características de elemento epitelial. Corte de pulmão. A. 3.992.

Caso n. 6 — A. 2.882 — Dr. A. Pena de Azevedo — 3-10-1936.

A. C., sexo masculino, 42 anos, nacionalidade brasileira, cor preta, servente.

No brônquio esquerdo e gânglios linfáticos peribrônquicos, há um tecido opaco, estranho à região, aderente ao tecido pulmonar; este mostra-se desintegrado nessa região e apresenta áreas de consolidação. Metástases nos gânglios linfáticos tráqueo-brônquicos e na pleura.

Exame microscópico: O tumor é constituido por células pavimentosas bastante anaplásicas, com produção de pérolas epiteliais e intensa necrose. Nas metástases, é observada a mesma estrutura.

Diagnóstico: Carcinoma infiltrante hilar de células pavimentosas (carcinoma epidermoide), com metástases nos ganglios linfáticos tráqueo-brônquicos e na pleura.

Caso n. 7 — A. 3.550 — Dr. C. M. Torres — 15-9-1937.

T. G., sexo masculino, 46 anos, nacionalidade brasileira, cor preta, serralheiro.

Estreitamento e presença de tecido neoplásico de coloração amarela, no brônquio esquerdo; invasão de quase todo o lobo superior do pulmão esquerdo, pelo tecido neoplásico; metástases nos gânglios linfáticos da bifurcação da traquéia e nos gânglios cervicais.

Exame microscópico: O tumor é constituido por células pequenas, de núcleo redondo, hipercromático, às vezes mutinucleadas, anaplásicas, com abundante necrose. Nas metástases, a mesma estrutura é observada.

Diagnóstico: Carcinoma infiltrante hilar de células indiferenciadas (células basais), com metástases nos gânglios linfáticos da bifurcação da traquéia e cervicais.

Caso n. 8 —A. 3.793 — Dr. C. M. Torres — 27-7-1938.

D. E. S., sexo meminino, velha (idade ignorada), nacionalidade brasileira, com preta, doméstica.

Estenose do brônquio esquerdo, cuja parede é infiltrada por tecido neoplásico. Presença de "massas autônomas" de tecido neoplásico, substituindo o tecido pulmonar (pulmão esquerdo). Metástases na pleura, gânglios linfáticos inter-tráqueo-brônquicos e inter-brônquicos, fígado e peritônio.

Exame microscópico: As células constituintes do tumor são ora pequenas, arredondadas, ora alongadas; são de núcleo hipercromático, principalmente as primeiras, apresentando o tumor acentuada vascularização e áreas múltiplas de necrose. Nas metástases, observa-se a mesma estrutura.

Diagnóstico: Carcinoma infiltrante hilar de células indiferenciadas (células basais e intermediárias) (pseudosarcoma).

Caso n. 9. — A. 3.937 — Dr. C. M. Torres — 4-1-1939.

L. Z. B., sexo masculino, 60 anos, nacionalidade brasileira, cor branca, operário.

Pleura fortemente espessada; no pulmão direito, aumento do tecido conjuntivo, sob a forma de traves fibrosas. Ausência de nódulos ou tecido estranho, macroscopicamente reconhecivel, nos pulmões. Numerosos nódulos de tecido neoplásico, de cor amarela esbranquiçada, firmes, geralmente isolados, no fígado. Metástases no peritônio e na pleura.

Exame microscópico: O tumor é constituido por células cilídricas, frequentemente em disposição alveolar e acinosa, associadas a proliferação fibrosa e possuindo áreas pequenas de necrose. Igual estrutura observa-se nas metástases.

Diagnóstico: Carcinoma difuso de células cilíndricas (adenocarcinoma), com metástases no fígado, peritonio e pleura.

Caso n. 10 — A. 3.979 — Drs. A. P. de Azevedo e S. C. da Silveira — 27-2-1939.

I. F., sexo masculino, 46 anos, nacionalidade portuguesa, cor branca, operário.

Tumor maior que uma laranja, no lobo superior do pulmão esquerdo, infiltrando-se para o hilo; outro nódulo, independente do primeiro, junto ao hilo. O tecido estranho é de cor amarelada, encerrando áreas de consistência amolecida e de cor rósea amarelada. Metástases na região anterior e posterior do sacro e da 4.ª vértebra dorsal.

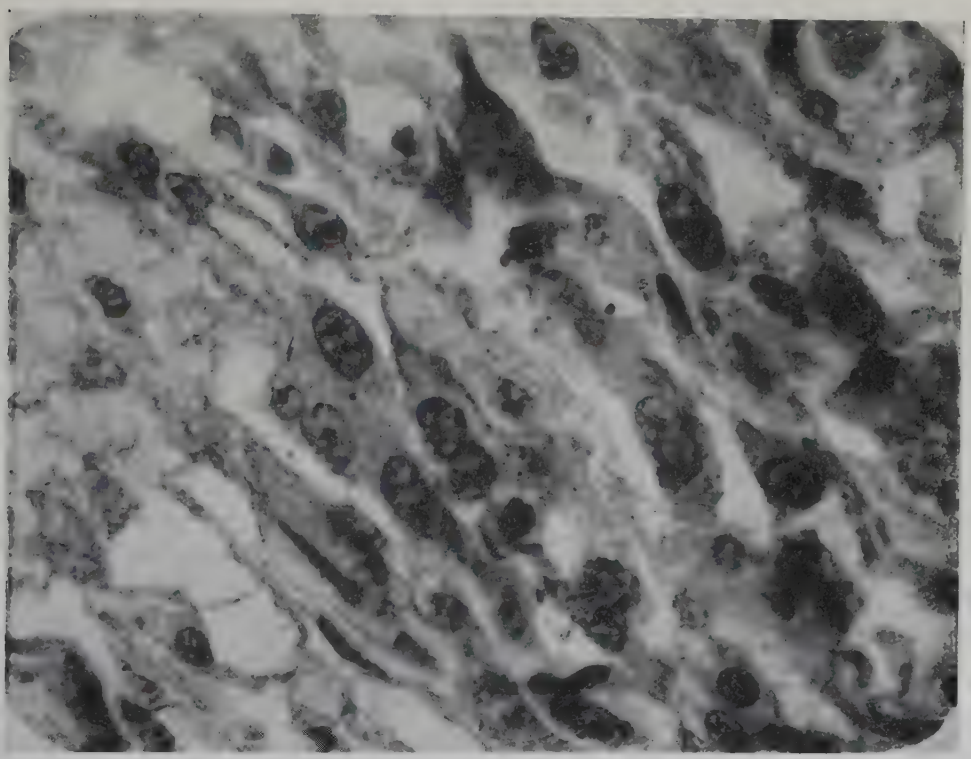


Fig. 5 — Carcinoma de células indiferenciadas, notando-se a acentuada atipia celular. Corte de pulmão. A. 3.992.

Exame microscópico: O tumor é constituido por células particularmente anaplásicas, com numerosas células gigantes multinucleadas. Reconhece-se a estrutura predominante de células intermediárias, ocorrendo diferenciação e formação de células cilíndricas. Extensa necrose do tumor.

Diagnóstico: Carcinoma infiltrante hilar de células indiferenciadas (intermediárias), com metástases no sacro e na 4.ª vértebra dorsal.

Caso n. 11 — A. 3.992 — Dra. Rita Alves de Almeida — 14-3-1939.

A. C., sexo masculino, 52 anos, nacionalidade brasileira, cor preta, operário.

Presença do tecido blastomatoso no brônquio direito, havendo ulceração da parede;

pequenos nódulos do mesmo tecido, no pulmão direito. O tecido tem coloração amarela e estrutura uniforme. Metástases múltiplas no fígado e nos gânglios linfáticos mediastínicos e mesentéricos.

Exame microscópico : O tumor é constituido por células fusiformes, de aspecto pseudo-sarcomatoso, não apresentando diferenciação; ocorre necrose, com certa frequência. Nos cortes de fígado, é possivel observar, ao lado de zonas com estrutura pseudo-sarcomatosa, outras em que as células adquirem diferenciação cilíndrica. Nos gânglios linfáticos, a estrutura é de células indiferenciadas.

Diagnóstico : Carcinoma infiltrante hilar de células indiferenciadas (basais e intermediárias) — Forma pseudosarcomatosa. Metástases no fígado e gânglios linfáticos mediastínicos e mesentéricos.

Caso n. 12 — A. 4.155 — Drs. C. B. de Figueiredo e A. P. de Azevedo — 13-6-1929.

A. M. N., sexo masculino, 23 anos, nacionalidade brasileira, cor branca, operário.

Aderente à face interna do plastrão esternal, há uma massa volumosa, invadindo todo o mediastino anterior e aderindo fortemente ao pericádio e pulmões. Nódulos, às vezes conglomerados, em ambos os pulmões. O tecido blastomatoso é branca-cento, opaco, tumefato, às vezes necrosado.

Exame microscópico : Tumor constituido por células indiferenciadas basais, necrosado. No estroma existe degenerescência mucinosa. Não foram observadas metástases, Ao exame microscópico, tuberculose do baço e do gânglio linfático.

Diagnóstico : Carcinoma infiltrante hilar de células indiferenciadas (basais).

Caso n. 13 — A. 4.652 — Dr. A. P. de Azevedo — 8-5-1939.

A. E. L., sexo masculino, 55 anos, nacionalidade portuguesa, cor branca, operário.

Formação nodular, bosselada, do tamanho de uma laranja, em relação direta com o brônquio direito e infiltrando o lobo superior, em toda a sua extensão, sob a forma de tecido brancoamarelado, opaco, em parte desintegrado ; nódulos isolados no lobo inferior. Metástases nos gânglios linfáticos do mediastino, do hilo do pulmão direito, perigástricos, peripancreáticos, do hilo do fígado e glândula suprarrenal esquerda.

Exame microscópico : O tumor é constituido por células indiferenciadas, predominantemente células basais, com intensa capacidade infiltrativa e necrose. Nas metástases, é observada a mesma estrutura, existindo, na suprarrenal, zonas em que as células são de tipo fusiforme.

Diagnóstico : Carcinoma infiltrante hilar de células indiferenciadas (basais), com metástases nos gânglios linfáticos e na glândula suprarenal esquerda.

Caso n. 14 — A. 4.878 — Dr. C. M. Torres — 28-3-1940.

M. C. S., sexo masculino, 42 anos, nacionalidade portuguesa, cor branca, operário.

Nódulos de cor amarela, alguns amolecidos, com aspecto caseoso, no lobo superior do pulmão direito. Aumento de tecido conjuntivo na vizinhança dos nódulos. Metástases no fígado, gânglios linfáticos e peritônio.

Exame microscópico : As células do tumor são do tipo pavimentoso, formando pérolas epiteliais e sofrendo, com frequência, necrose extensa.

Diagnóstico: Carcinoma nódular de células pavimentosas (carcinoma epidermóide), com metástases no fígado, gânglios linfáticos e peritônio.

Caso n. 15 — A. 5.008 — Dr. C. M. Torres — 26-7-1926.

A. P., sexo masculino, 52 anos, nacionalidade portuguesa, cor branca, sapateiro.

Nódulo, do volume de um ovo de galinha, na região da bifurcação da traquéia, fortemente aderente aos orgãos locais, e relacionando-se diretamente com tecido do mesmo aspecto, que ocupa grande parte do lobo inferior do pulmão direito. Há outro nódulo, circunscrito, de cerca de 3 cm. de diâmetro, no mesmo lobo do pulmão direito. Metástases nos gânglios linfáticos peribrônquicos.

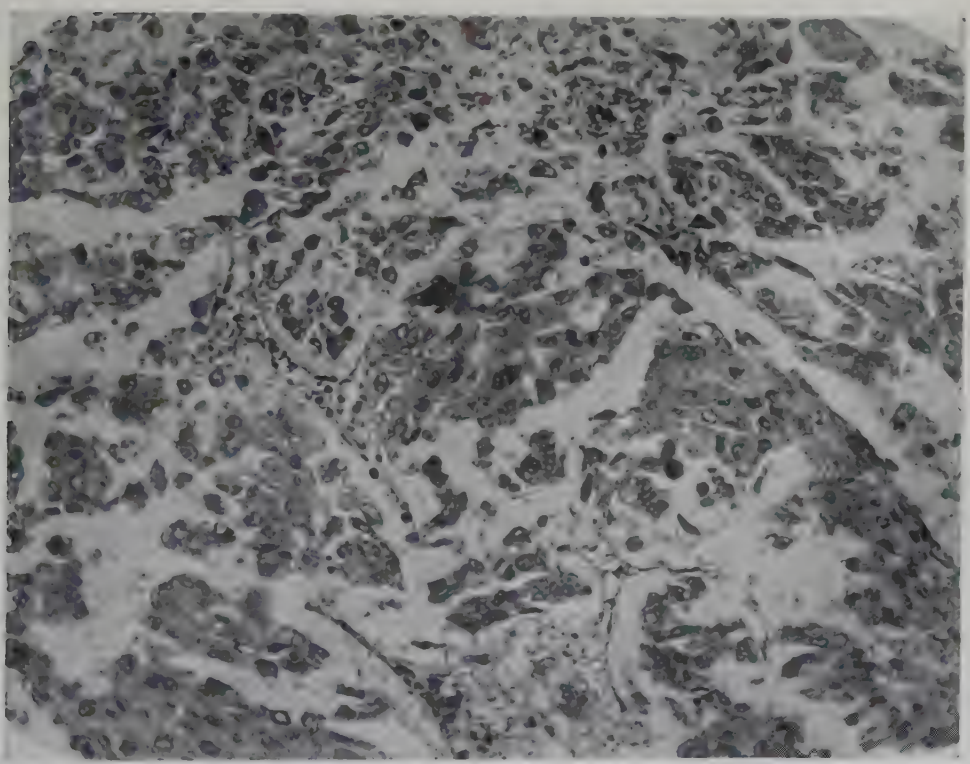


Fig. 6 — Diferenciação celular em metástase de carcinoma de células indiferenciadas do pulmão. Corte de fígado. Corresponde ao mesmo caso das figs. 2, 3, 4 e 5.

Exame microscópico: Tumor constituido por células indiferenciadas (basais e intermediárias).

Diagnóstico: Carcinoma infiltrante hilar de células indiferenciadas (basais e intermediárias), com metástases nos gânglios linfáticos peribrônquicos.

Caso n. 16 — A. 5.493 — Drs. C. M. Torres e A. P. de Azevedo — 9-12-1929.

B. V. N., sexo masculino, 40 anos, nacionalidade brasileira, cor preta, operário.

Nódulos, em geral fusionados, de tecido brancacento, opaco, úmido, algum tanto proeminentes, situados no terço inferior do lobo superior e em todo o lobo médio do pulmão direito. Metástases nos gânglios linfáticos, fígado, rins e suprarrenal.

Exame microscópico: Tumor constituido por células epiteliais cilíndricas, com nítida formação acino-glândular e extensa necrose.

Diagnóstico: Carcinoma nodular de células cilíndricas (adenocarcinoma), com metástases nos gânglios linfáticos, fígado, rins e suprarrenal.

Caso n. 17 — A. 5.502 — Drs. C. M. Torres e Eudoro Villela — 3-1-1930.

Z. P., sexo feminino, 45 anos, nacionalidade brasileira, cor branca, doméstica.

Volumosa massa de tecido estranho, de coloração rósea e aspecto opaco, fazendo corpo com o pulmão esquerdo, existindo, porem, uma nitida linha de separação entre o tecido neoplásico e o pulmonar; o nódulo tumoral mede 18,5 x 14 x 15 cm., e é, em parte, calcificado. Brônquio esquerdo incluido na massa tumoral, com a cavidade ocupada por tecido neoplásico.

Exame microscópico: Tumor constituido por células indiferenciadas (basais e intermediárias), apresentando necrose no centro de algumas áreas. Em alguns cortes de pulmão, o tumor é constituido não só por células de tipo fusiforme, pseudo-sarcomatosas, como tambem por células anaplásicas, algumas gigantes, multinucleadas e, ocasionalmente, com diferenciação cilíndrica.

Não foram vistas metástases.

Diagnóstico: Carcinoma infiltrante hilar de celulas indiferenciadas (basais e intermediárias).

Caso n. 18 — A. 5.592 — Dr. C. M. Torres — 5-1-1931.

M. P. G., sexo masculino, 53 anos, nacionalidade portuguesa, cor branca, operário.

Volumoso nódulo, medindo 10 x 6,5 x 5 cm., ocupando exatamente a bifurcação da traquéia. Obliteração parcial do brônquio esquerdo, com erosão da mucosa e ulceração. Nódulos no brônquio direito e muitos outros, pequenos, proeminentes, confluentes, no pulmão esquerdo. O tecido tumoral tem cor amarela esbranquiçada.

Exame microscópico: O blastoma é constituido por células indiferenciadas, alongadas, do tipo intermediário, com zonas frequentes de necrose, apresentando o aspecto pseudo-sarcomatoso..

Diagnóstico: Carcinoma infiltrante hilar de células indiferenciadas (intermediarias).

Caso n. 19 — A. 5.604 — Dr. C. M. Torres — 10-3-1932.

J. C., sexo masculino, 69 anos, nacionalidade síria, cor branca, comerciante.

Na ramificação do brônquio direito, existe tecido estranho, friavel, de cor amarela, com pontos de coloração rósea. Há tambem nódulos desse tecido no pulmão direito e um outro, do volume de um ovo de galinha, no lobo superior do pulmão esquerdo. Metástases no fígado e gânglios linfáticos peribrônquicos.

Exame microscópico: As células do tumor são do tipo indiferenciado, pequenas, arredondadas, sem limites nítidos, de núcleo hipercromático, sendo frequentes e extensas as zonas de necrose, e, ocasionalmente, encontrando-se algumas células gigantes multinucleadas. Nas metástases, a estrutura do tumor apresenta o mesmo aspecto.

Diagnóstico: Carcinoma infiltrante hilar de células indiferenciadas (basais), com metástases no fígado e gânglios linfáticos peribrônquicos.

Caso n. 20 — A. 5.650 — Dr. C. M. Torres — 24-6-1932.

J. A., sexo masculino, 53 anos, nacionalidade portuguesa, cor branca, comerciante.

Massas de cor amarela, ocupando a maior parte do lobo inferior do pulmão esquerdo. Brônquio esquerdo obliterado pelo mesmo tecido. Nódulos pequenos, menores que a cabeça de um alfinete, no lobo superior do pulmão esquerdo; nódulo do blastoma recalcando o diafragma, sendo possivel sua dissociação, na base do pulmão direito. Metástases no fígado e gânglios linfáticos peribrônquicos.

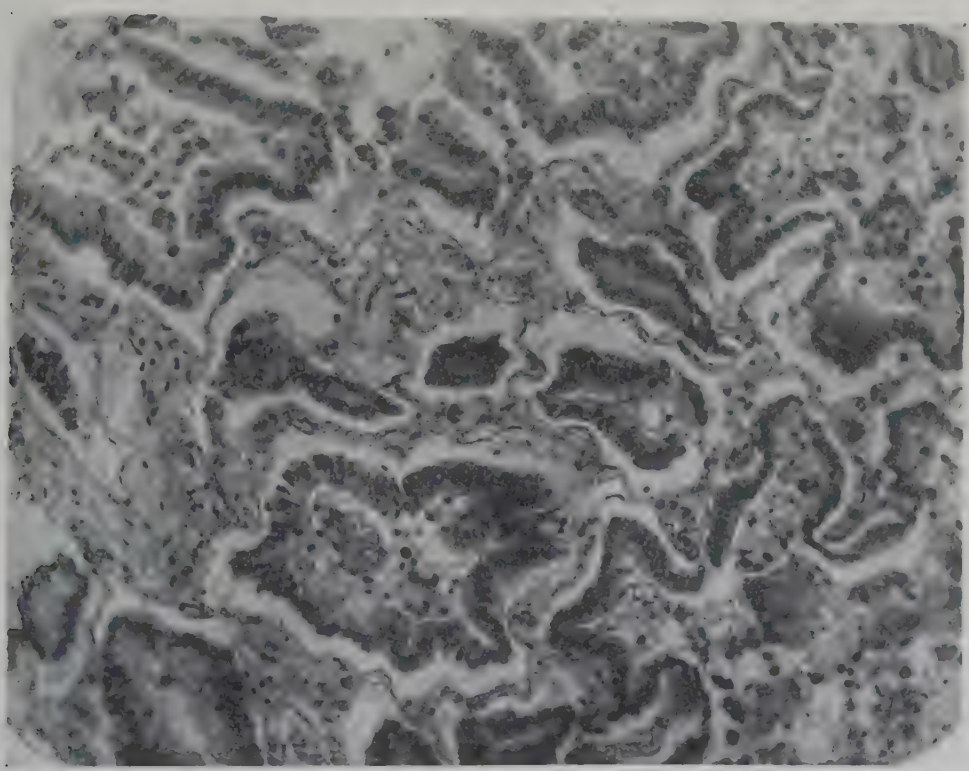


Fig. 7 — Carcinoma de células diferenciadas (cilíndricas) reproduzindo algumas vezes, o aspecto acinoso. Corte de pulmão. A. 6.900.

Exame microscópico: O tumor é constituido por células do tipo basal, apresentando frequentemente áreas de necrose. Nas metástases, a estrutura do tumor é a mesma observada no ponto de origem.

Diagnóstico: Carcinoma infiltrante hilar de células indiferenciadas (basais), com metástases no fígado, gânglios linfáticos.

Caso n. 21 — A. 6.257 — Dr. A. P. de Azevedo — 28-11-1932.

J. J. M., sexo masculino, 52 anos, nacionalidade brasileira, cor branca, mecânico.

Nódulo, do tamanho de um ovo de galinha, constituido por tecido de cor branca amarelada, opaco, situado na espessura do lobo superior do pulmão direito. Morte por pneumonia lobar.

Exame microscópico : O tumor é constituido por células indiferenciadas, predominando as do tipo basal, apresentando áreas múltiplas de necrose.

Diagnóstico : Carcinoma nodular de células indiferenciadas (basais).

Caso n. 22 — A. 6.270 — Dr. A. P. de Azevedo — 15-12-1932.

M. T. S., sexo masculino, 59 anos, nacionalidade espanhola, cor branca, pedreiro.

Nódulo, do tamanho de uma laranja, medindo 8 cm. de diâmetro, na espessura do lobo superior do pulmão direito; nódulos de aspecto semelhante nos lobos inferiores de ambos os pulmões. O tecido tumoral é de cor amarelada, opaco, friavel, desintegrado em certas porções. Brônquios livres. Metástases no fígado, gânglios linfáticos cervicais, retro-esternais, do hilo pulmonar, traqueo-brônquicos, perigástricos, peripancreáticos, do hilo do fígado, retroperitoniais e paraaórticos.

Exame microscópico : O tumor apresenta a mesma estrutura, tanto na região de origem como nas metástases. As células são de tipo basal, sofrendo, com frequência, necrose, por vezes extensa.

Diagnóstico : Carcinoma nodular de células indiferenciadas (basais), com metástases no fígado e gânglios linfáticos.

Caso n. 23 — A. 6.626 — Dr. A. P. de Azevedo — 18-8-1934.

M. R., sexo masculino, 93 anos, nacionalidade russa, cor branca, profissão ignorada.

Massa oval, de 2 cm., de diâmetro, superfície irregular, coloração branca amarelada, opaca, consistência mole, comprometendo a parede do grosso brônquio direito e propagando-se ao mediastino; no pulmão direito, nódulos de volume variavel, alguns em relação imediata com a neoformação brônquica. Nódulos menores no pulmão esquerdo. Metástases no fígado, rins, pleura, e gânglios linfáticos do mediastino, infraclaviculares e retroperitoniais.

Exame microscópico : O tumor é constituido por células de tipo cilíndrico, anaplásicas, em disposição alveolar, nunca formando acinos. As áreas de necrose são extensas. Ocorre acentuar a existência associada de tuberculose pulmonar. Nas metástases, observa-se a mesma estrutura do tumor.

Diagnóstico : Carcinoma infiltrante hilar de células cilíndricas, com metástases no fígado, rins, pleura, e gânglios linfáticos.

Caso n. 24 — A. 6.900 — Dr. A. P. de Azevedo — 1-11-1935.

E. C., sexo feminino, 65 anos, nacionalidade brasileira, cor parda, doméstica.

Ao nivel do ápice do pulmão esquerdo, a pleura é espessada, irregular, encontrando-se, ao corte, proliferação de tecido fibroso, firme, não se percebendo a existência de nódulos bem definidos. Mucosa dos brônquios, íntegra. Metástases no epicárdio, miocárdio, cérebro e gânglios linfáticos do mediastino anterior e cervicais inferiores.

Exame microscópico : Nos cortes de pulmão, observa-se a existência de tecido blastomatoso, constituido por células cilíndricas elevadas, dispostas em alvéolos de larga

luz acompanhando o estroma dos proprios alvéalos pulmonares, muito desenvolvido. Nas metástases, observa-se, de modo geral, que as células são, alem de atípicas, volumosas, achatadas, mais se aproximando do tipo pavimentoso: o tumor possue abundante estroma, mostrando-se, em certos cortes, particularmente desmoplásico. Em alguns cortes de cérebro, observa-se a estrutura não só de células cilíndricas, como tambem de células pavimentosas, sem nenhuma tendência a queratinização.

Diagnóstico: Carcinoma difuso de células cilíndricas (adenocarcinoma), com metástases no cérebro (lobo occipital direito), epicárdio, miocárdio e gânglios linfáticos cervicais inferiores e do mediastino anterior.

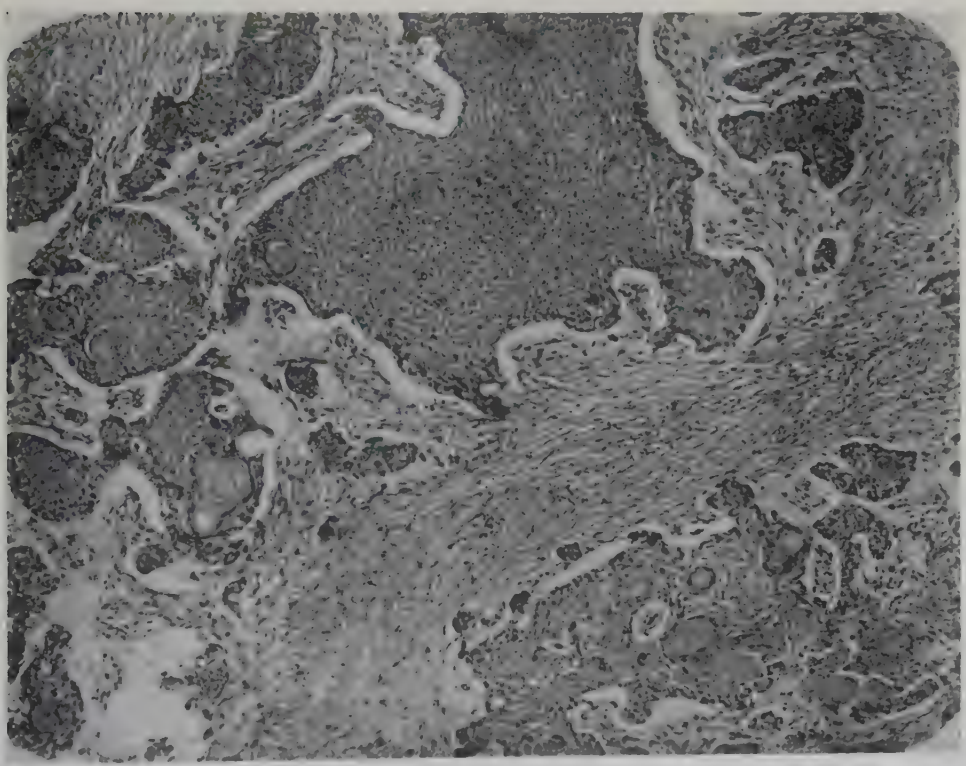


Fig. 8 — Carcinoma de células diferenciadas (pavimentosas) chegando a formar pérolas epiteliais. Corte de pulmão. A. 4.878.

Caso n. 25 — A. 7.056 — Drs. C. M. Torres e J. M. Sampaio — 26-3-1941.

A. M., sexo masculino, 49 anos, nacionalidade portuguesa, cor branca, lavrador.

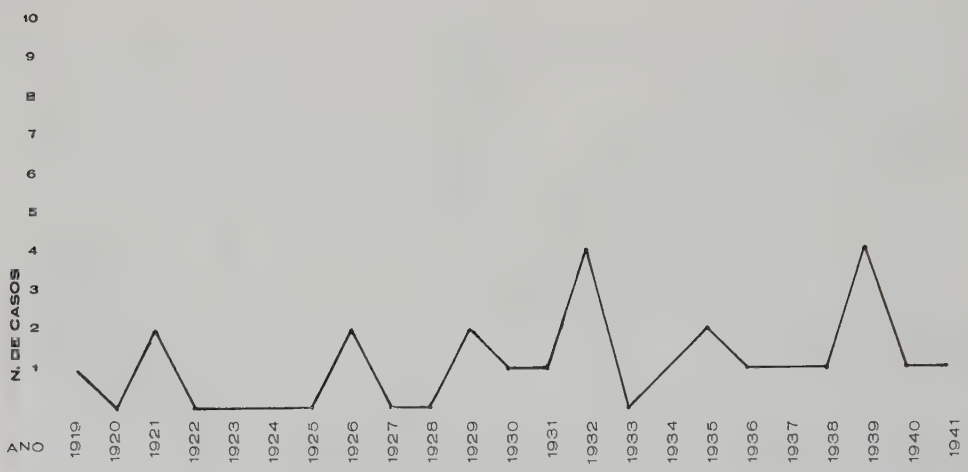
Na espessura da parede do brôquio direito, existe tecido neoplásico, que se continua com extensas massas do mesmo tecido, ocupando cerca de 3|4 do volume do pulmão direito. Metástases nos gânglios linfáticos peribrônquicos e lombares, no fígado e suprarrenais.

Exame microscópico: Blastoma constituido por células cilíndricas, anaplásicas, dispostas em alvéolos providos de larga luz, apresentando áreas extensas de necrose. Nas metástases, o tumor é mais rico de estroma conjuntivo e, só excepcionalmente, existem formações acinosas.

Diagnóstico: Carcinoma infiltrante hilar de células cilíndricas (adenocarcinoma), com metástases no fígado, suprarrenais, gânglios linfáticos.

CARCINOMA DO PULMÃO

DISTRIBUIÇÃO ANUAL




Em resumo, de acordo com os elementos fornecidos pelo exame do material, constituido por 25 casos de carcinoma primário do pulmão, conclue-se:

*Tipo anatômico*

Carcinoma infiltrante hilar — A. 1.508, 1.695, 2.882, 3.550, 3.793, 3.979, 3.992, 4.155, 4.652, 5.008, 5.502, 5.592, 5.604, 5.650, 6.626 e 7.056.

Carcinoma nodular — A. 1.200, 1.487, 2.737, 4.878, 5.493, 6.257 e 6.270.
Carcinoma difuso — A. 3.937 e 6.900.

| | | |
|---|---|---|
| Infiltrantes hilares ..... | 16 casos — | 64 % |
| Nodulares. ..... | 7 casos — | 28 % |
| Difusos. ..... | 2 casos — | 8 % |

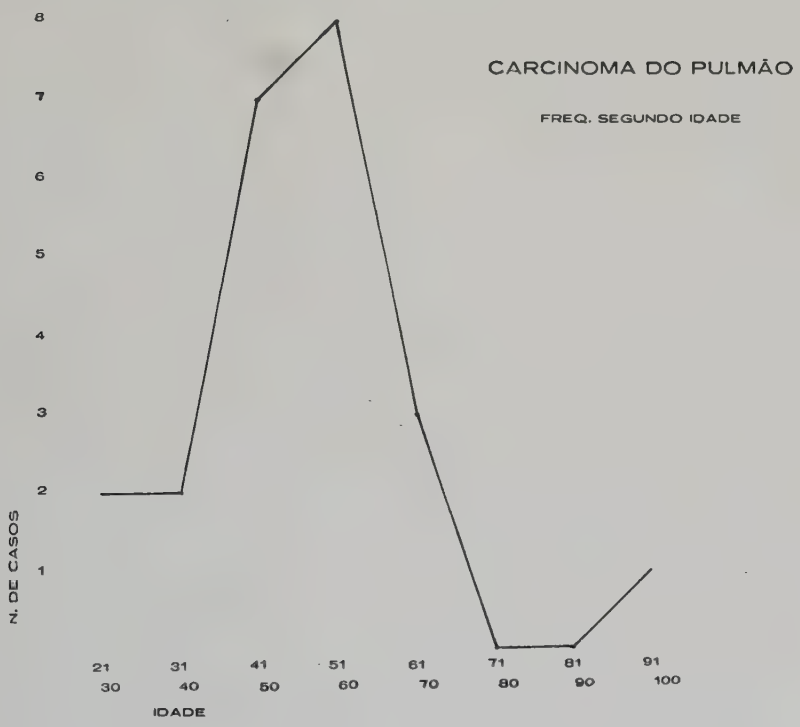
*Tipo histológico*

Carcinoma de células indiferenciadas — A. 3.550, 3.793, 3.979, 3.992, 4.155, 4.652, 5.008, 5.502, 5.592, 5.604, 5.650, 6.257 e 6.270.

Carcinoma de células cilíndricas — A. 1.200, 1.487, 1.695, 3.937, 5.493, 6.626, 6.900 e 7.056.

Carcinoma de células pavimentosas — A. 1.508, 2.737, 2.882 e 4.878.

| | | |
|---|---|---|
| Carcinoma de células indiferenciadas | 13 casos | — 52 % |
| Carcinoma de células cilíndricas .... | 8 casos | — 32 % |
| Carcinoma de células pavimentosas.. | 4 casos | — 16 % |




## METÁSTASES

*Carcinoma de células indiferenciadas* — 13 casos

A. 3.550 — Gânglios linfáticos.
A. 3.793 — Gânglios linfáticos — Fígado — Pleura — Peritônio.
A. 3.979 — Sacro, 4.ª vértebra lombar.
A. 3.992 — Gânglios linfáticos — Fígado.
A. 4.155 — Sem metástases.
A. 4.652 — Gânglios linfáticos — Suprarrenal.
A. 5.008 — Gânglios linfáticos.

A. 5.502 — Sem metástases.
A. 5.592 — Sem metástases.
A. 5.604 — Gânglios linfáticos — Fígado.
A. 5.650 — Gânglios linfáticos — Fígado.
A. 6.257 — Sem metástases.
A. 6.270 — Gânglios linfáticos — Fígado.

Resumo

| | |
|---|---|
| Nos gânglios linfáticos | 8 vezes |
| No fígado | 5 vezes |
| Na pleura | 1 vez |
| No peritônio | 1 vez |
| Nos ossos | 1 vez |
| Sem metástases | 3 vezes |

Incidência das metástases : 10 vezes em 13 casos — 76,9 %.

*Carcinoma de células cilídricas* — 8 casos

A. 1.200 — Gânglios linfáticos — Fígado.
A. 1.487 — Fígado.
A. 1.695 — Gânglios linfáticos — Fígado — Pleura — Pericárdio.
A. 3.937 — Fígado — Peritônio — Pleura.
A. 5.493 — Gânglios linfáticos — Fígado — Rins — Suprarrenal.
A. 6.626 — Gânglios linfáticos — Fígado — Rins — Pleura.
A. 6.900 — Gânglios linfáticos — Pericárdio — Miocárdio — Cérebro.
A. 7.056 — Gânglios linfáticos — Fígado — Suprarrenal.

Resumo

| | |
|---|---|
| No fígado | 7 vezes |
| Nos gânglios linfáticos | 6 vezes |
| Na pleura | 3 vezes |
| No peritônio | 1 vez |
| No pericárdio | 2 vezes |
| Nos rins | 2 vezes |
| Nas suprarrenais | 2 vezes |
| No miocárdio | 1 vez |
| No cérebro | 1 vez |

Incidência das metástases: 8 vezes em 8 casos: 100 %.

*Carcinoma de células pavimentosas* — 4 casos.

A. 1.508 — Gânglos linfáticos.
A. 2.737 — Gânglios linfáticos — Fígado.

A. 2.882 — Gânglios linfáticos — Pleura.
A. 4.878 — Gânglios linfáticos — Fígado — Peritônio.

Resumo.

| | |
|---|---|
| Nos gânglios linfáticos | 4 vezes |
| No fígado | 2 vezes |
| Na pleura | 1 vez |
| No peritônio | 1 vez |

Incidência das metástases: 4 vezes em 4 casos — 100 %.

*Incidência das metástases*: 22 vezes em 25 casos: 88 %.

Do carcinoma de células indiferenciadas — 10 vezes em 13 casos — 76,9 %.
Do carcinoma de células cilíndricas .... — 8 vezes em 8 casos — 100 %.
Do carcinoma de células pavimentosas.. — 4 vezes em 4 casos — 100 %.

*Incidência das metástases nos vários orgãos*

| | | |
|---|---|---|
| Gânglio linfático | 18 vezes | — 72 % |
| Fígado | 14 " | — 56 % |
| Pleura | 3 " | — 12 % |
| Peritônio | 2 " | — 8 % |
| Pericárdio | 2 " | — 8 % |
| Rins | 2 " | — 8 % |
| Suprarrenais | 2 " | — 8 % |
| Cérebro | 1 vez | — 4 % |
| Osso | 1 vez | — 4 % |

*Distribuição segundo a cor*

| | | |
|---|---|---|
| Branca | 18 casos | — 72 % |
| Preta | 6 casos | — 24 % |
| Parda | 1 caso | — 4 % |

*Distribuição segundo o sexo*

| | | |
|---|---|---|
| Masculino | 21 casos | — 84 % |
| Feminino | 4 casos | — 16 % |

*Distribuição segundo a nacionalidade*

| | | |
|---|---|---|
| Brasileira | 12 casos | — 48 % |
| Estrangeira | 13 casos | — 52 % |

Distribuindo-se os casos estudados de acordo com a representação esquemática de WELLER, deve ser observada a ordem seguinte :

7.056 1.508
6.900
5.493 2.737
3.937
1.487
6.626 2.882
1.695
1.200 4.878
5.592
3.979
5.502
5.508
3.992
3.793
6.270
6.257
5.650
5.604
4.652
4.155
3.550

| N. DO CASO | N. DA NECROPSIA | DATA DA NECROPSIA | IDADE | SEXO | COR | PROFISSÃO | NACIONALIDADE | TIPO ANATÔMICO | TIPO HISTOLÓGICO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1.200 | 1919 | 21 | M | Brança | ? | Brasileira | Nodular | Carc. de cél. cilíndricas |
| 2 | 1.487 | 1921 | 32 | M | » | ? | Portuguesa | » | » » » » |
| 3 | 1.508 | 1926 | 52 | M | » | Sapateiro | » | Infiltrante hilar | » » » pavimentosas |
| 4 | 1.695 | 1921 | ? | M | » | » | » | » » | » » » cilíndricas |
| 5 | 2.737 | 1935 | 61 | F | Preta | Doméstica | Brasileira | Nodular | » » » pavimentosas |
| 6 | 2.882 | 1936 | 42 | M | » | Servente | » | Infiltrante hilar | » » » » |
| 7 | 3.550 | 1937 | 46 | M | » | Serralheiro | » | » » | » » » indiferenciadas |
| 8 | 3.793 | 1938 | ? | F | » | Doméstica | » | » » | » » » » |
| 9 | 3.937 | 1939 | 60 | M | Branca | Operário | » | Difuso | » » » cilíndricas |
| 10 | 3.979 | 1939 | 46 | M | » | » | Portuguesa | Infiltrante hilar | » » » indiferenciadas |
| 11 | 3.992 | 1939 | 52 | M | Preta | » | Brasileira | » » | » » » » |
| 12 | 4.155 | 1929 | 23 | M | Branca | » | » | » » | » » » » |
| 13 | 4.652 | 1939 | 55 | M | » | » | Portuguesa | » » | » » » » |
| 14 | 4.878 | 1940 | 42 | M | » | » | » | Nodular | » » » pavimentosas |
| 15 | 5.008 | 1926 | 52 | M | » | Sapateiro | » | Infiltrante hilar | » » » indiferenciadas |
| 16 | 5.493 | 1929 | 40 | M | Preta | Operário | Brasileira | Nodular | » » » cilíndricas |
| 17 | 5.502 | 1930 | 45 | F | Branca | Doméstica | » | Infiltrante hilar | » » » indiferenciadas |
| 18 | 5.592 | 1931 | 53 | M | » | Operário | Portuguesa | » » | » » » » |
| 19 | 5.604 | 1932 | 69 | M | » | Comerciante | Síria | » » | » » » » |
| 20 | 5.650 | 1932 | 53 | M | » | » | Portuguesa | » » | » » » » |
| 21 | 6.257 | 1932 | 52 | M | » | Mecânico | Brasileira | Nodular | » » » » |
| 22 | 6.270 | 1932 | 59 | M | » | Pedreiro | Espanhola | » | » » » » |
| 23 | 6.626 | 1934 | 93 | M | » | ? | Russa | Infiltrante hilar | » » » cilíndricas |
| 24 | 6.900 | 1935 | 65 | F | Parda | Doméstica | Brasileira | Difuso | » » » » |
| 25 | 7.056 | 1941 | 49 | M | Branca | Lavrador | Portuguesa | Infiltrante hilar | » » » » |

## RESUMO

Em um período de 23 anos, de 1919 a 1941, observaram-se 25 casos de carcinoma primário do pulmão entre o total de 6.458 necrópsias, registadas na Secção de Anatomia Patológica do Instituto Osvaldo Cruz e realizadas nos vários hospitais do Rio de Janeiro. Os indivíduos eram de procedência variada, não só de diferentes regiões do Brasil, como tambem de alguns paises estrangeiros. A incidência do carcinoma primário do pulmão, considerado como causa mortis, entre o total das necrópsias é de 0,38 % e, entre os casos de cancer, 4,5 %. Em referência ao sexo, 21 casos eram de indivíduos masculinos (84 %) e 4 femininos (16 %), fornecendo a relação de 5:1. Dos 25 casos, 13 (52 %) eram de nacionalidade estrangeira e 12 (48 %) brasileira; 18, em indivíduos de cor branca, 6 pretos e 1 pardo. Em relação à idade, a maior incidência ocorreu entre 41 e 70 anos, com o máximo entre 51 a 60, existindo casos extremos de 21 e 93 anos.

A forma anatômica mais frequente, no mesmo material, é a infiltrante hilar, 16 casos (64 %), seguindo-se a nodular, com 7 casos (28 %) e a difusa, 2 casos (8 ). O carcinoma de células indiferenciadas é o tipo histológico mais comum, existindo em 13 casos (52 %), seguindo-se o tipo de células cilíndricas, em 8 casos (32 %) e o de células pavimentosas em 4 casos (16 %).

A incidência das metástases foi observada em 22 casos (88 %), sendo, para o carcinoma de células indiferenciadas, de 76,9 %, e, tanto para o carcinoma de células cilíndricas como para o de células pavimentosas, de 100%. Em três casos (12 %), não foram observadas metástases.

Entre os orgãos sede frequente das metástases, foi observada a seguinte relação: gânglios linfáticos, 72 %; fígado, 56 %; pleura, 12 %; peritônio, pericárdio, rins e suprarrenal, 8 %; cérebro e osso, 4 %.

Nos últimos 10 anos (1932 a 1941), ocorreram 16 casos (64 % do total dos 25 encontrados), demostrando senão o aumento do cancer pulmonar, certamente o maior número de diagnóstico positivos.


Aquí deixamos consignados os nossos agradecimentos aos doutores C. Magarinos Torres, C. Burle de Figueiredo, Osvino Alvares Penna, O. D'Utra e Silva, Cesar Guerreiro, Eudoro Vilela e S. Coutinho da Silveira pelas informações colhidas de necrópsias por eles realizadas.


## SUMMARY

*Primary carcinoma of the lung.*

For a period of 23 years, from 1919 until 1941, 25 cases of primary lung carcinoma have been observed amongst the total number of 6.458 post

mortem examinations, registered at the Section of Pathological Anatomy of the Osvaldo Cruz Institute and performed at various hospitals of Rio de Janeiro. The individuals were of varying descent, not only from different Brasilian regions, but also from several foreign countries. The incidence of primary lung carcinoma, considered as causa mortis, amongst the total number of necropsies is 0.38 % and amongst the cases of cancer, 4.5 %. As to sex, 21 cases are male (84 %) and 4 of female individuals (16 %), giving the ratio of 5:1. Out of the 25 cases, 13 (52 %) were aliens and 12 (48 %) of Brasilian nationality; 18 in individuals of white, 6 of black colour and 1 in a mulatto. As to age, the largest incidence ocurred between 51 and 60, there being also extreme cases with 21 and 93 years.

The most frequent anatomical form, in the same material, is the infiltrating hilar, 16 cases (64 %), folowed by the nodular form with 7 cases (28 %) and by the diffused one in 2 cases (8 %). The undifferenciated cell carcinoma is the most commonly met with, observed in 13 cases (52 %), followed by that of cylindrical cell in 8 cases (32 %) and by that of squamous cell in 4 cases (16 %).

Incidence of metastasis was observed in 22 cases (88 %): 76.9 % for the undifferenciated cell carcinoma, and 100 % for each of the other two, either of cylindrical or of squamous cells.

In 3 cases (12 %) no metastasis was observed. As to the organs, which are the frequent seat of metastasis, the following order was observed: lymph nodes, 72 %; liver, 56 %; pleura, 12 %; peritoneum, pericardium, kidney and suprarrenals, 8 %; brain and bone, 4 %.

In the last 10 years (1932 until 1941) 16 cases occurred (64 % of the total number 25) showing, if not an increase of lung cancer, certainly a larger number of positive diagnosis.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barnard, W. G.
1926. The nature of the "oat-celled sarcoma" of the mediastinum. Jour. Path. a. Bact. 29:241.

2. Boyd, W.
1926. Citado por Klotz (n. 11).

3. Brines, O. A. and Kenning, J. C.
1926. Citados por Klotz (n. 11).

4. Brockbank, W.
1932. Occupational incidence of primary lung cancer Quart. Jour. Med. 1 n. s. 31.

5. Frissell, L. F. and Knox, L. C.
1937. Primary carcinoma of lung. Am. Jour. Cancer, 30:219.

6. Halpert, B.
1939. Pathologic aspects of bronchiogenic carcinoma. Med. a. Surg. Jour. 91:439.

7. Halpert, B.
1941. Carcinoma of lung. Jour. Am. Med. Ass. 117:13.

8. Halpert, B. and Pearson B.
1940. The cellular structure of carcinoma of the lung. Am. Jour. Cancer, 40:213.

9. Jaffé, R. H.
1935. The primary carcinoma of the lung. Am. Jour. Cancer, 20:1.227.

10. Kennaway, M. N. and Kennaway, E. L.
1936. A study of the incidence of cancer of the lung and larinx. Jour. Hyg. 36:236.

11. Klotz, M. O.
1938. Carcinoma of the lung. Am. Jour, Med. Sc. 196:436.

12. McNally, W. D.
1932. The tar in cigarrete smoke and its possible effects. Am. Jour. Cancer, 16:1.502.

13. Miller, William Snow..
1928. The epithelium of the lower respiratory tract. Specitl Cytology, I:71. Paul Hoeber Inc. New York.

14. Rosedale, R. S. and MaKay, D. R.
1936. A study of 57 cases of bronchogenic carcinoma. Am. Jour. Cancer, 26:493.

15. Samson, P. C.
1935. Endifferentiation in bronchogenic carcinoma. Am. Jour. Cancer, 23:754.

16. Scot, E. and Forman, J.
1916. Primary carcinoma of the lungs. Med. Rec. 90:452.

17. Simpson, S. L.
1929. Primary carcinoma of the lung. Quart. Jour. Med. 22:413.

18. Thomas, B. A.
1926. The influence of urology on longevity. Jour. Am. Med. Assi. 86:1957.

19. Torres, C. Magarinos e Penna de Azevedo, A.
1927. Sobre alguns casos de carcinoma primitivo do pulmão, do brônquio e da traquéia. Mem. Inst. Ovwaldo Cruz, 20.

20. Weller, C. V.
1913. Primary carcinoma of the larger bronchi. Arc. Int. Med. 11:314.

21. Weller, C. V.
1929. The pathology of primary carcinoma of the lung. Arch. Path. 7:478.

22. Weller, C. V.
1929. Entdifferentiation on primary carcinoma of the bronchi and lung. Jour. Concer Res. 13:218.

23. Wells, H. G. and Cannon, P. R.
1930. Primary carcinoma of lung following trauna. Arch. Path. 9:869.

# Contribuição ao conhecimento das larvas dos Sarcophagidae com especial referência ao esqueleto cefálico (Diptera) (*)

por

H. de Souza Lopes

(Com 90 figuras no texto)

Foram estudados estádios larvários de onze espécies de *Sarcophagidae* e de *Musca domestica* L., como termo de comparação. Nesta família o esqueleto cefálico é sempre fortemente quitinizado. As larvas apresentam um amplo reservatório alimentar (fig. 14) que acreditamos existir em todas as espécies da família, mesmo as de hábitos parasitários.

A nomenclatura do esqueleto cefálico proposta por Townsend em 1935 (Manual of Myiology 1: 44) foi adotada com pequenas restrições. Townsend considera o esqueleto cefálico constituido por três setores : *Labial* (com os escléritos: *labial, dentado, supralabial* e *oral*), *Hipostomal* (com os escléritos: *hipostomal, infra-hipostomal, sub-hipostomal, supra-hipostomal* e *mandibular*) e *Faringeal* (com os escléritos: *faringeal, dorso-faringeal* e *infra-faringeal*). Tonwsend considera o esclérito *oral* como um produto do *pseudocéfalo* e afirma que se encontra enormemente desenvolvido no 1.º estádio de *Titanogrypa*. Acontece que as placas quitinosas intensamente pigmentadas de *Titanogrypa larvicida* Lop. são formações do 1.º segmento torácico e não do *pseudocéfalo*. Não podemos considerar tais placas como esclérito *oral*. Há, habitualmente, nos *Sarcophagidae*, um anel incompleto que está situado ventralmente, no início do tubo digestivo, logo apos a língua e que não encontramos análogo nas descrições de Townsend.

O *sub-hipostomal* está situado entre os ramos anteriores do esclérito *infra-hipostomal*. O tubo alimentar, logo depois do *atrium* passa entre o *supra-labial* e o anel quitinoso ventral (fig. 12) e, logo atrás deste, entre as duas placas do *sub-hipostomal*. Townsend considera a placa dorsal como

* Recebido para publicação a 14 de janeiro e dado à publicidade em abril de 1943.

um esclérito distinto do *sub-hipostomal* a que denomina *supra-hipostomal.* De fato, algumas vezes, esta placa está bem destacada no dorso do setor *hipostomal,* especialmente em larvas do 1.º estádio. Acontece porem que, em outros estádios, há uma divisão mediana de cada uma destas placas que se podem soldar lateralmente de modo a formarem ainda duas placas, mas agora separadas dorsal e ventralmente (*Musca domestica* L. 2.º estádio). Outras vezes, há uma soldadura da placa dorsal com a ventral que só é interrompida na face dorsal (2.º estádio de *Titanogrypa larvicida* Lop., 2.º estádio de *Udamopyga setigena* End.). Há pois formação de um anel que envolve o tubo faringeano. E' preferivel considerar estas formações como um só esclérito que se pode apresentar interrompido dorsal e ventralmente ou lateralmente de modo a formar uma, duas, 3 ou 4 placas.

*Larvas do 1.º estádio*

Pseudocéfalo, frequentemente membrânoso em toda a extensão, pode apresentar formações transversais que partem do esclérito *dentado,* dirigem-se obliquamente pelo *atrium* e vão terminar nas faces laterais. Há faixas de maior quitinização, pigmentadas ou não, em forma de calha (*Udamopyga setigena* End.), às vezes apenas indicadas (*Udamopyga neivai* Lop.), ou apresentando estrias transversais pouco nítidas (*Sarothromyia femoralis* Schin.). Em *Osysarcodexia angrensis* Lop. estas faixas são substituidas por complicada ornamentação formada por estrias transversais largas e muito nítidas, encontradas em várias espécies do gênero. Estas formações são bem representadas em *Musca domestica* L. por três faixas hialinas muito distintas. Há ainda espinhos que podem formar uma série ventral (*Udamopyga setigena* End.) ou grupos laterais (*Titanogrypa larvicida* Lop.). Outras formações quitinosas podem ser encontradas e, entre elas, a cápsula fortemente pigmentada que ocupa grande parte do pseudocéfalo de *Titanogrypa larvicida* Lop.

O 1.º segmento torácico tem, habitualmente, em maior ou menor extensão, espinhos na margem anterior, que variam em forma e posição. São pequenos e muito numerosos (*Udamopyga setigena* End.), reunidos em pequenos grupos (*Osysarcodexia angrensis* Lop.), pouco numerosos e limitados à face ventral (*Sarothromyia femoralis* Schin.), constituidos em duas ou três pontas (*Titanogrypa larvicida* Lop.) ou grandes e pouco numerosos (*Lepidodexia sarcophagina* Towns., *Protodexia* sp.). Estes espinhos se podem reunir em placa pigmentada, especialmente na margem anterior inva-

ginada do segmento. Esta placa, às vezes reduzida (*Udamopyga setigena* End.) pode se tornar volumosa e fortemente pigmentada (*Udamopyga neivai* Lop.) ou ser subdividida em três placas distintas (*Titanogrypa larvicida* Lop.).

O esclérito *labial,* formado por um par de peças simétricas frequentemente unidas na base em maior ou menor extensão, tem sempre uma larga base. A extremidade livre é algumas vezes pouco curva (*Udamopyga setigena* End., *U. neivai* Lop., *Titanogrypa larvicida* Lop., *Lepidodexia sarcophagina* Towns.), outras vezes apresenta curvatura em ângulo reto (*Oxysarcodexia spp., Sarothromyia femoralis* Schin.). Em *Sarcophaga carnaria* L. a curvatura é ainda mais acentuada. Em *Protodexia sp.* esta extremidade é fortemente achatada e termina em ponta. Em *Musca domestica* L. este esclérito é único, quitinoso apenas na extremidade anterior e ligado intimamente ao *hipostomal.*

O *dentado* pode estar inteiramente incorporado ao *labial* (*Sarcophaga carnaria* L., *Udamopyga setigena* End., *U. neivai* Lop., *Titanogrypa larvicida* Lop., *Protodexia sp.*) ou separado por zona de menor pigmentação (*Oxysarcodexia amarali* Prado & Fonseca, *O. angrensis* Lop., *Sarothromyia femoralis* Schin.). Em *Musca domestica* L. este esclérito está situado muito distante do *labial.* De qualquer modo forma sempre as margens laterais do *atrium* e o *labial,* em *Sarcophagidae,* a região dorsal do *atrium.*

O *supra-labial,* quase sempre incorporado ao *labial,* se destaca em duas pontas (*U. neivai* Lop.) ou se torna individualizado (*S. carnaria* L., *Protodexia sp.*). O anel quitinoso incompleto que forra ventralmente a luz faringeana, em oposição ao *supra-labial,* pode ser bem constituido (*Udamopyga setigena* End.) ou ausente (*Oxysarcodexia spp., Sarothromyia femoralis* Schin.). Em *Titanogrypa larvicida* Lop. toma um desenvolvimento muito grande e é constituido em placa. Townsend (1935) identifica as placas quitinosas da margem ventral do 1.º segmento torácico de *Titanogrypa* ao esclérito *oral* dizendo que estas placas são formações do pseudocéfalo. Nem estas placas, resultantes da fusão dos espinhos ventrais, nem o anel ventral da luz faringeana, neste gênero constituido em placa, podem ser considerados como formações do *pseudocéfalo.*

O *Hipostomal* se encontra sempre soldado ao *faringeal* constituindo-se algumas vezes como longa e estreita barra bem separada do *sub-hipostomal* (*Oxysarcodexia spp., Sarothromyia femoralis* Schin.). Outras vezes forma com o *sub-hipostomal* uma peça larga (*Udamopyga neivai* Lop, *Titanogrypa*

*larvicida* Lop., *Lepidodexia sarcophagina* Towns.). Em *Musca domestica* L. é representado por longa barra delgada.

O *Infra-hipostomal* se localiza facilmente quando se observa o conduto das glândulas salivares que aí desemboca, quase sempre, em nítida saliência ventral. Quando não está bem individualizado e forma uma peça forte com o *hipostomal,* o exame de dorso permite a verificação. E' constituido por duas traves, geralmente situadas entre os ramos do *hipostomal,* unidas posteriormente por uma região mais ou menos pigmentada.

O *Sub-hipostomal* é constituido por duas placas, uma dorsal e uma ventral. Estas placas são habitualmente pouco pigmentadas, teem as margens laterais em contacto de modo a formar um tubo. Nem sempre as placas são facilmente perceptiveis e, quando pigmentadas, deixam ver regiões circulares sem pigmentação, simulando orifícios. Em alguns casos a placa dorsal se destaca em exame de perfil (*Oxysarcodexia spp., Sarothromyia femoralis* Schin., *Protodexia sp.*).

O *Faringeal* se apresenta com zonas de maior ou menor pigmentação. Geralmente a zona mais pigmentada é a central, sendo frequentemente mais claros os ramos posteriores do esclérito ou mesmo o ramo anterior dorsal. O ramo posterior dorsal pode ser mais longo que o ventral (*Sarcophaga carnaria* L., *Oxysarcodexia angrensis* Lop., *Titanogrypa larvicida* Lop.) ou os ramos posteriores podem ter o mesmo comprimento (*Oxysarcodexia amarali* P. & F., *Sarothromyia femoralis* Schin.). Os ramos anteriores dorsais podem ser ligados pelo *dorso-faringeal* e habitualmente atingem o nivel do *hipostomal,* mas em *Oxysarcodexia spp.* e *Sarothromyia femoralis* Schin. não chegam a atingir a base deste esclérito. O ramo supero-dorsal falta inteiramente em *Protodexia sp.* e é apenas indicado em *Lepidodexia sarcophagina* Towns. Acreditamos que este aspecto morfológico corresponda as parasitismo obrigatório da larva.

O *Infra-faringeal* inteiramente ausente em todas as larvas do 1.º estádio, aparece muito nítido em *Protodexia* como assinala Townsend em 1935.

Pelo exame das larvas do 1.º estádio, observa-se a grande semelhança entre as larvas de *Oxysarcodexia spp.* e *Sarothromyia femoralis* Schin. que teem estrutura muito diversa das demais larvas saprófagas examinadas. *Sarcophaga carnaria* L. forma um tipo bem definido, tem um conduto de glândulas salivares muito forte e *labial* muito curvo. *Udamopyga neivai* Lop. apresenta quitinização da margem ventral do 1.º segmento torácico que aparece extraordinariamente desenvolvido em *Titanogrypa larvicida* Lop. Aquí

parece haver convergência biológica porque ambas as espécies se alimentam em moluscos mortos.

*Larvas do 2.º estádio*

Pseudocéfalo sempre membranoso, sem formações especiais, mesmo quando a espécie apresenta estruturas quitinosas no 1.º estádio (*Titanogrypa larvicida* Lop., *Udamopyga setigena* End., *Osysarcodexia angrensis* Lop.). Os canalículos do atrium são habitualmente numerosos.

*Labial* pouco curvo (*Titanogrypa larvicida* Lop.), de extremidade sinuosa (*Udamopyga setigena* End.) ou denteado na extremidade (*Oxysarcodexia angensis* Lop.). Em *Musca domestica* L. este esclérito é delgado e tem o ápice curvo, havendo dois pequenos dentes situados anteriormente ao *labial*.

O *Dentado* se encontra separado do labial. Em *Musca domestica* L. este esclérito tem grande desenvolvimento e apresenta espinhos anteriores.

O *supra-labial*, geralmente incorporado ao *labial* se apresenta constituindo apófises dorsais deste esclérito. Em *Musca domestica* L. o *supra-labial* está inteiramente isolado. O anel quitinoso ventral se apresenta, nas espécies examinadas, como uma placa.

*Hipostomal* constituido por uma pequena barra inteiramente ligada ao *faringeal* e situada sobre o *infra-hipostomal*.

*Infra-hipostomal* sempre muito desenvolvido e constituido em *H.* Está quase sempre bem separado do *faringeal* mas se une a este esclérito em *Titanogrypa larvicida* Lop.

O *Sub-hipostomal*, situado sempre entre os ramos anteriores do *infra-hipostomal*, apresenta as placas fusionadas com separação dorsal (*Udamopyga setigena* End., *Titanogrypa larvicida* Lop.) ou se constitue em duas placas ventrais e uma dorsal.

O setor *faringeal*, nos *Sarcophagidae* examinados tem o ramo posterior dorsal bífido e mais longo que o ventral. Em *Musca domestica* L. os ramos posteriores teem mais ou menos o mesmo comprimento. O *supra-faringeal* é sempre presente.

*3.º estádio*

*Pseudocéfalo* membranoso sem vestígio das formações quitinosas do 1.º estádio. Os canalículos do atrium são frequentemente abundantes.

*Labial* forte, habitualmente pouco curvo na extremidade livre. Constituido nos *Sarcophagidae* por duas peças que se apresentam fusionadas em *Musca domestica* L.

O *dentado*, quase sempre bem individualizado, em *Protodexia sp.* está incorporado ao labial. O *supra-labial* pode ligar posteriormente os dois escleritos *labiais* (*Paraphrissopoda chrysostoma* Wied), ser ausente (*Udamopyga neivai* Lop., *Titanogrypa larvicida* Lop.) ou estar representado por duas peças justapostas (*Oxysarcodexia amarali* P. & F.). O anel ventral é bem constituido em *Paraphrissipoda chrysostoma* Wied, *Oxysarcodexia angrensis* Lop. e *Sarothromyia femoralis* Schin, tem forma triangular em *Townsendimyia halli* Engel e é representada por duas pequenas zonas pigmentadas em *Protodexia sp.*

O setor *hipostomal* é constituido de modo muito semelhante ao do 2.º estádio. O *sub-hipostomal*, raramente constituido em anel pela fusão das placas (*Titanogrypa larvicida* Lop.), tem geralmente três ou quatro peças bem individualizadas.

O *faringeal* habitualmente muito pigmentado, pode apresentar zonas dorsais de menor pigmentação (*O. angrensis* Lop., *S. femoralis* Schin.). O ramo posterior dorsal é sempre mais longo que o ventral e tem profunda fenda posterior que o divide em duas partes convergentes (*Paraphrissopoda chrysostoma* Wied., *Titanogrypa larvicida* Lop.) ou não convergentes (*Udamopyga neivai* Lop. *Townsendimyia halli* Engel). Em *Protodexia sp.* não se nota esta subdivisão do ramo posterior dorsal que apresenta faixas oblíquas despigmentadas. O ramo posterior ventral pode ser bífido, franjado ou inteiro. O *dorso-faringeal* é presente em todas as espécies examinadas, mesmo quando não está representado no 1.º estádio (*Protodexia* sp.).

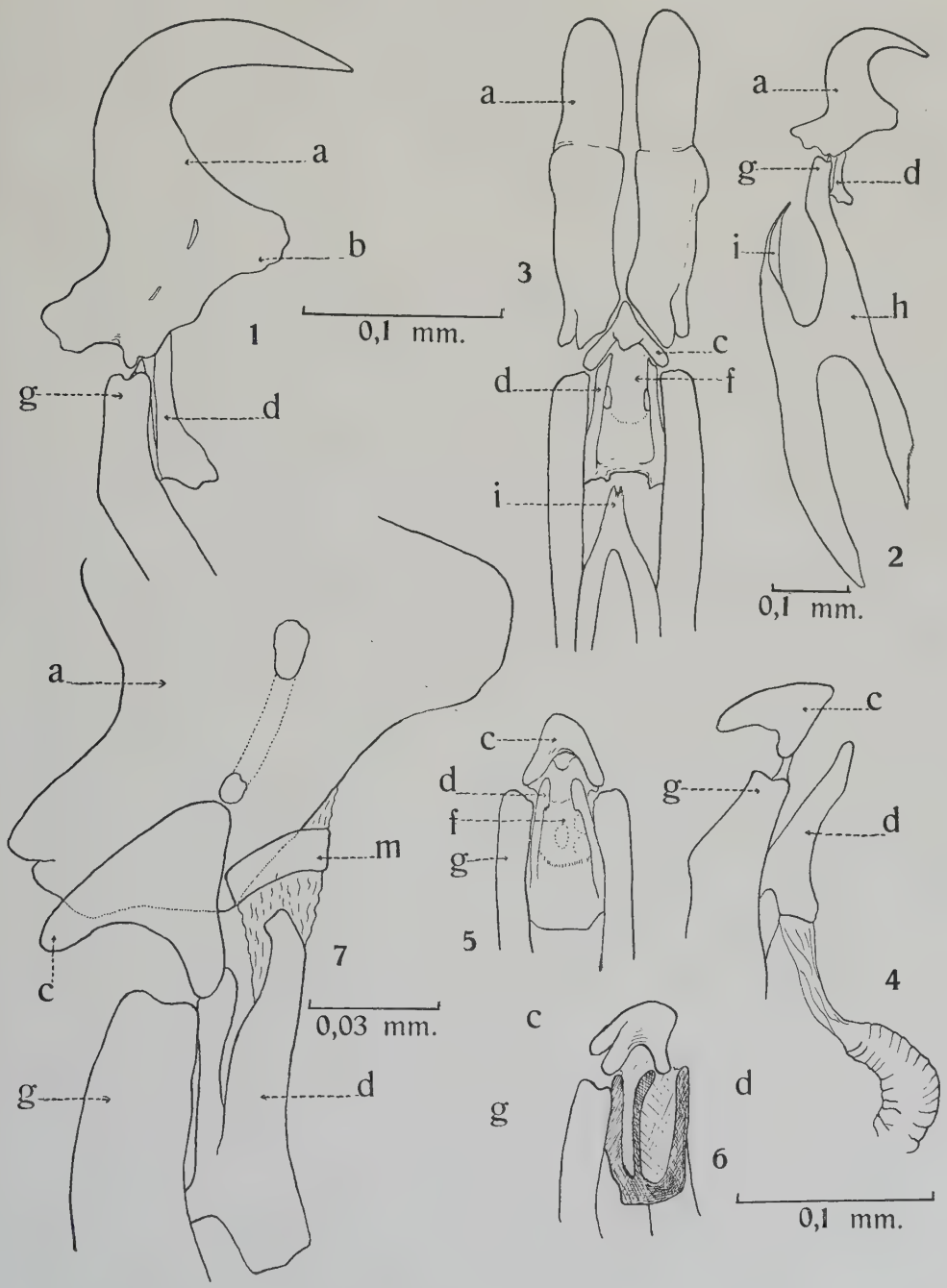
A parede ventral do faringe é recoberta, nas larvas saprófagas, por canalículos longitudinais que, nos *Sarcophagidae*, se iniciam em placa ventral do setor faringeal. Esta placa deve representar o esclérito infra-hipostomal que se encontra constituido em trave longitudinal no 1.º estádio de *Protodexia sp.*

*Sarcophaga carnaria* (Linné, 1758)

(Figs. 1 a 7)

Larva do 1.º estádio : esqueleto cefálico :

*Labial*: extremidade distal muito curva. Fortemente quitinizado e intimamente unido ao *dentado*, havendo entre os escléritos dois orifícios facilmente perceptiveis (fig. 1, - *a*, *b*).




*Sarcophaga carnaria* (L., 1758), larva I — Fig. 1: esqueleto cefálico, vista lateral; — Fig. 2: esqueleto cefálico, vista lateral; — Fig. 3: esqueleto cefálico, vista dorsal da extremidade anterior; — Fig. 4: região intermediária, vista lateral; — Fig. 5: esclérito infra-hipostomal, vista ventral; — Fig. 6: esclérito infra-hipostomal; — Fig. 7: região intermediária, vista lateral. (Para a legenda das figuras veja página 163).

*Supra-labial* : esclérito muito quitinoso encaixado entre os dois labiais de modo a não ser visivel quando as peças são examinadas de perfil (fig. 4 - *c*). Tem três apófises, duas das quais repousam sobre as pontas dorsais do esclérito *infra-hipostomal* e a terceira se insinua entre as faces basais do *labial* e é bem visivel quando os escléritos são observados pelo dorso (fig. 3 - *c*). Este esclérito forma a parede dorsal no início do faringe e está situado em oposição a uma placa em anel incompleto que sustenta inferiormente este conduto (fig. 7 - *m*).

*Infra-hipostomal* : este esclérito tem forma muito especial nesta espécie. A forma em *H* habitualmente encontrada nos outros estádios evolutivos está aquí profundamente modificada. Os ramos inferiores deste *H* sofreram uma torsão para cima e se tornaram paralelos aos ramos superiores (fig. 6 - *d*). Na barra mediana transversa se insere o conduto das glândulas salivares que é mais resistente que nas demais espécies e apresenta estriações transversais muito nítidas.

*Supra-hipostomal* : ausente

*Sub-hipostomal* : muito pouco quitinizado, encontra-se entre ramos do *infra-hipostomal* forrando o faringe superior e inferiormente (fig. 3 - *f*). Ligado ao esclérito ventral do sub-hipostomal há, anteriormente, um esclérito em forma de anel incompleto que marca o início do faringe.

*Hipostomal* : Intimamente ligado ao ramo anterior e ventral do *faringeal*, observando-se apenas uma ligeira mudança de direção que indica a soldadura dos dois encléritos (fig. 2 - *g*).

*Faringeal* : bem constituido e fortemente quitinoso. O ramo dorsal deste esclérito se une ao ventral por estreita região (fig. 2 - *h*).

*Dorso-faringeal* : bem constituido, unindo os ramos dorsais do faringeal onde não se nota diferença de pigmentação (fig. 3 - *i*).

*Infra-faringeal* : não individualizado, unido ao ramo ventral do faringeal.

As larvas que serviram a esta descrição foram retiradas do abdome de uma fêmea proveniente da Alemanha, E. Lindner leg. B. Rohdendorf det, capturada a 26-V-1921.

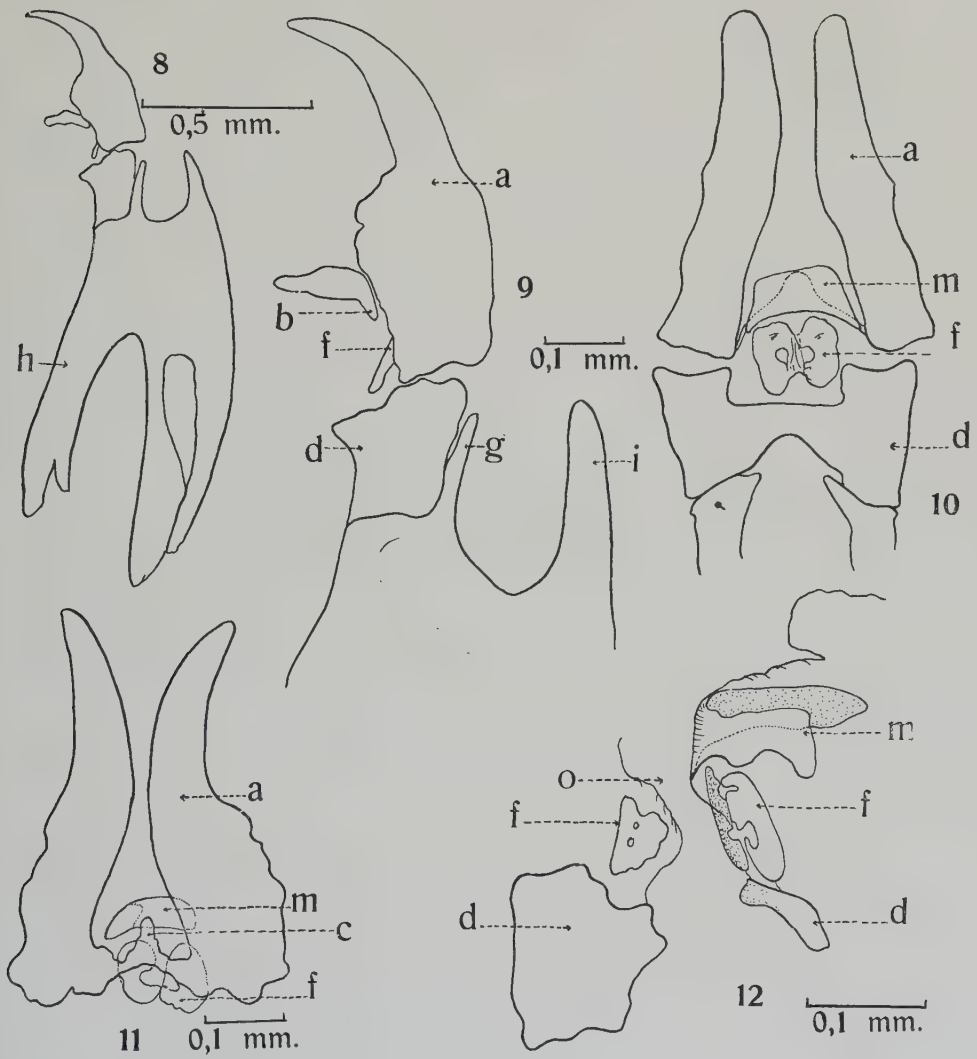
*Paraphrissopoda chrysostoma* (Wied., 1830)

(Figs. 8 a 16)

Larva do 3.º estádio : esqueleto cefálico :

*Labial* : visto de perfil tem a metade basal engrossada e a extremidade distal pouco curva. E' muito compacto e somente com dificuldade se divisa um pequeno orifício basal (fig. 9 - *a*).

*Dentado* : bem diferenciado do *labial,* de forma alongada e muito pigmentado (fig. 9 - *b*).




*Paraphrissopoda chrysostoma* (Wied., 1830), larva III — Fig. 8: esqueleto cefálico, vista lateral; — Fig. 9: esqueleto cefálico, vista lateral; — Fig. 10: extremidade anterior, vista ventral; — Fig. 11: extremidade anterior, vista dorsal; — Fig. 12: extremidade anterior da região faringeana; o ramo impar transverso do esclérito infra- hipostomal foi deslocado. (Para a legenda das figuras veja página 163).

*Supralabial* : situado na base e no dorso do *labial,* tem forma triangular e os ângulos laterais se unem ao *labial* por uma região irregularmente pigmentada (fig. 11 - *c*). Não é visivel de perfil.

*Infra-hispostomal* : é o esclérito mais desenvolvido da região intermediária (fig. 9 - *d*). Tem um prolongamento ventral que corresponde à trave mediana, abaixo da qual vai ter o conduto da glândula salivar. Visto de dorso (fig. 10 - *d*) tem a forma de um *H* sendo que os ramos laterais se soltam do ramo impar com relativa facilidade. Esta peça está encaixada no esclérito faringeal mas os seus limites são bem definidos.

*Supra-hipostomal* : ausente. Em algumas espécies o *supralabial* parece ser este esclérito e tem, mais ou menos, esta posição. Nesta espécie esta confusão não se faz porque o *supralabial* é soldado ao labial.

*Sub-hipostomal* : Entre os ramos anteriores da peça em *H* (*infra-hipostomal*) se acha um esclérito fracamente quitinoso que tem a forma de dois rins unidos pelo hilo (fig. 10 - *f*). Esta placa forra a parte ventral do conduto e se opõe a uma outra placa dorsal tambem fracamente pigmentada, perfurada em vários pontos. Imediatamente anterior a estas duas placas o conduto é ventralmente forrado por um anel incompleto de conformação muito nítida (fig. 12 - *m*). Provisoriamente consideramos estas três peças (duas ventrais e uma dorsal) como fazendo parte do esclérito *sub-hipostomal*.

*Hipostomal* : representado por um par de escleritos alongados e fortemente unidos ao *faringeal*, situados imediatamente no dorso do *infra-hipostomal* (fig. 9 - *g*).

*Faringeal* : fortemente quitinoso e pigmentado, tem os ramos subdivididos posteriormente em duas pontas (fig. 8 - *h*).

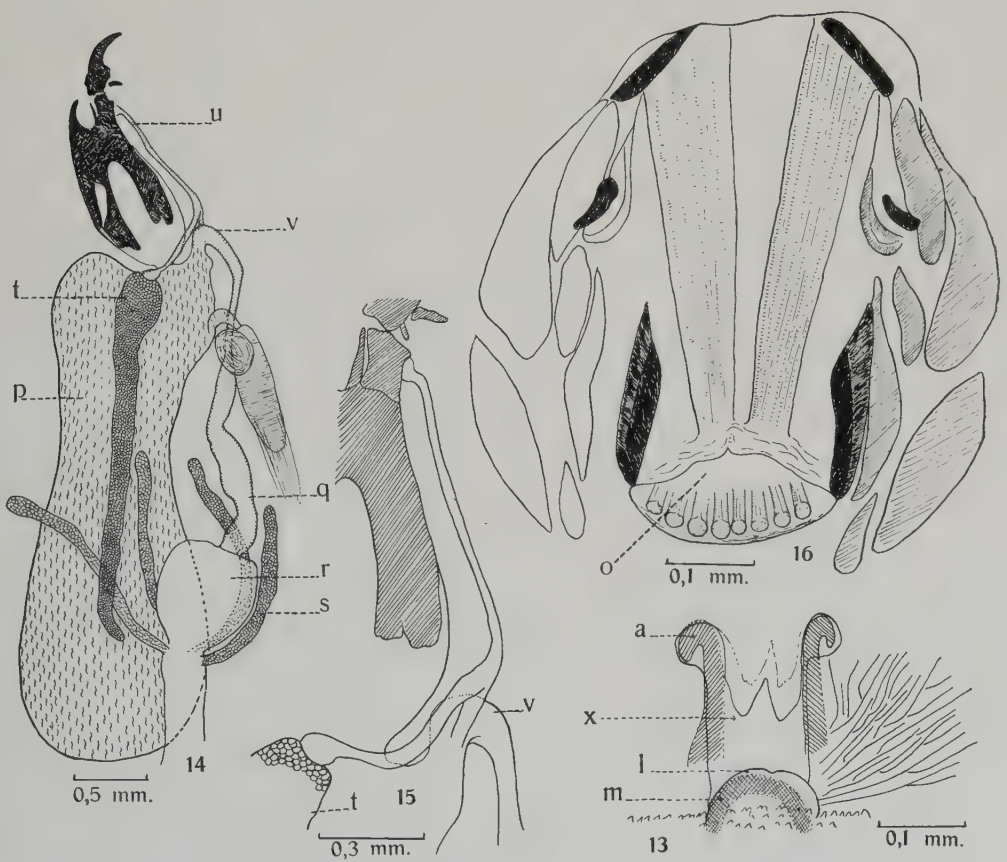
*Dorso-faringeal*: bem desenvolvido (fig. 8 - *i*), tem um ramo transverso situado um pouco antes do ápice e, desta forma, visto pelo dorso, apresenta duas pontas.

*Infra-faringeal* — não diferenciado do *faringeal*.

A região mediana ventral da margem anterior do primeiro segmento torácico que se encontra invaginada em oposição ao átrio apresenta numerosos espinhos muito unidos, sem, contudo, formarem placas. Em vários gêneros como *Udamopyga*, *Titanogrypa* e *Sarconeiva* há formação de uma ou mais placas quitinosas pela reunião destes espinhos.

*Cavidade bucal* : o *atrium* (fig. 13 - *x*) é formado lateralmente pelos escleritos labiais cujas pontas fazem saliência para fora. Interna e dorsalmente o *supra-labial* mantem separados os escleritos labiais. Superiormente o *atrium* apresenta dois lóbulos membranosos entre os escleritos labiais e ventralmente a língua tem forma semicircular (fig. 12 - *l*). A este amplo *atrium* se segue um tubo que se inicia logo atrás do esclérito *supra-labial* tendo como correspondente ventral o anel quitinoso incompleto ao qual se segue o *sub-*

*hipostomal* com seu correspondente dorsal que está situado entre os ramos anteriores do *infra-hipostomal* (fig. 12). O conduto passa dorsalmente ao ramo impar transverso do *infra-hipostomal* e logo após recebe o conduto das glândulas salivares. A luz do faringe é relativamente pequena e a sua parede ventral tem oito formações tubulares (fig. 16 - o) como já foi assinalado por




*Paraphrissopoda chrysostoma* (Wied., 1830), larva III — Fig. 13: boca da larva; — Fig. 14: região anterior do aparelho digestivo, vista lateral; — Fig. 15: conduto das glândulas salivares; — Fig. 16: faringe, corte transverso. (Para a legenda das figuras veja página 163).

Keilin (1915) para as larvas saprófagas. O faringe se comunica diretamente com um enorme divertículo em forma de saco dorsal do esôfago (fig. 14 - *p*). Nele se acumula substância ingerida pela larva e que será mais tarde aproveitada. Esse saco ocupa grande parte do corpo da larva e se comunica anteriormente com o esôfago (fig. 14 - *q*). Este descreve uma alça anterior, passa entre os gânglios cerebroides e vai ter ao proventrículo (fig. 14 - *r*).

As glândulas salivares são longas (fig. 14 - *t*), atingem a implantação dos cecuns do intestino médio; seus condutos se unem um pouco antes da alça esofagiana anterior. O conduto impar desemboca por uma pequena dilatação logo atrás do ramo impar transverso do esclérito *infra-hipostomal* (fig. 15-*u*).

Larvas de cultura em carne, Manguinhos, 27-VII-39.

*Udamopyga setigena* (Enderlein, 1928)

(Figs. 17 a 25)

*Udamoctis setigena* Enderlein, 1928, Ent. Mitt. 17:129.

*Udamopyga setigena* Hall, 1938, Arb. morph. tax. Ent. 5:256, fig. 3.

*Sarcophaga ogloblini* Lopes, 1939, Physis 17:119, figs. 1 e 2.

*Udamopyga ogloblini* Lopes, 1940, Rev. Entomologia 11:940, figs. 10, 12, 27, 28.

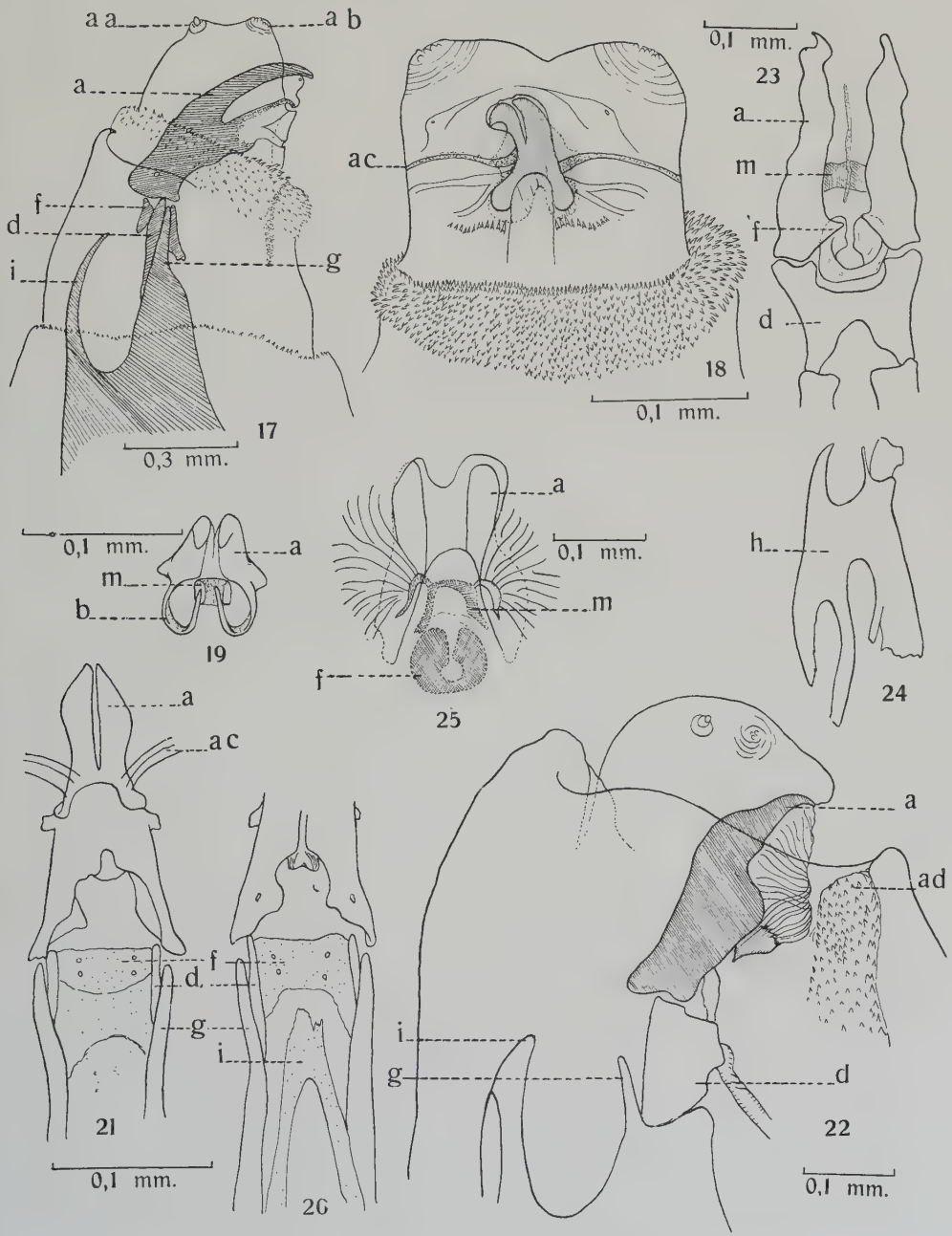
Esta espécie era considerada como espécie mal conhecida até que Hall (1938) publicou uma figura de genitália do macho. Este autor não refere à origem do material sobre o qual baseia a redescrição. Em 1940 consideramos *U. ogloblini* como a espécie figurada por Hall. Entretanto a referência de Hall é baseada no exemplar tipo da espécie de Enderlein como este autor nos informou por carta.

Larva do 1.º estádio :

Na face ventral do *pseudocéfalo* onde se abre o *atrium* encontram-se várias formações que representam o sistema de canalículos do 2.º e 3.º estádios. De diante para trás se notam : *a*) uma faixa quitinosa e bastante pigmentada que se inicia lateralmente, intromete-se pelo *atrium* e vai terminar no esclérito *dentado; b*) duas faixas menos pigmentadas que convergem para o *atrium* terminando no mesmo esclérito. Entre a primeira faixa e a segunda se forma uma região profundamente côncava, constituida como um canal. Para trás das duas faixas convergentes, de cada lado da língua, há uma série transversa de espinhos. O *atrium* se mantem aberto à custa das formações quitinosas (fig. 18 -ac).

*Labial*: bem desenvolvido, parte apical fracamente curva, base com dois orifícios, vestígios das soldaduras do *dentado* e do *supra-labial* (fig. 17-*a*). Medianamente os dois *labiais* são soldados, ficando livres apenas a extremidade anterior e a base (fig. 21 -a).

*Dentado*: profundamente soldado ao *labial*, forra internamente o *atrium*. Inferiormente os *dentados* se curvam para dentro e se aproximam, de modo




*Udamopyga setigena* (End., 1928) — Fig. 17: extremidade anterior da larva I, vista de perfil, — Fig. 18: extremidade anterior da larva I, vista ventral; — Fig. 19: esclérito labial da larva I, vista ventral; — Fig. 20: região hipostomal da larva I, vista dorsal; — Fig. 21: região hipostomal da larva I, vista ventral; — Fig. 22: extremidade anterior da larva II, vista lateral; — Fig. 23: esqueleto cefálico da larva II, vista dorsal; — Fig. 24: esclérito faringeal da larva II, vista lateral; — Fig. 34: *atrium* da larva II, vista ventral. (Para a legenda das figuras veja página 163).

que, em corte transversal, o *atrium* tem a forma de um *V* invertido (figura 19 -b). No início do tubo faringiano se nota, com a forma habitual, o anel quitinoso entre os ramos do *labial,* visivel apenas em dissecções.

*Infra-hipostomal*: bem individualizado, constituido por duas peças alongadas e dispostas entre e sobre o *hipostomal* (fig. 17 -d). Entre estas duas peças há uma região fracamente quitinizada, representando a trave mediana do esclérito (fig. 21 -d).

*Sub-hipostomal*: normalmente constituido entre os ramos do *infra-hipostomal* (fig. 20 -f).

*Hipostomal*: ligado inteiramente ao *faringeal* (fig. 20 -g).

*Dorso-faringeal* : bem constituido, unindo-se no ápice (fig. 20-i).

*Infra-faringeal* : não individualizado.

Na margem ventral do 1.º segmento torácico os espinhos são muito reunidos e robustos (fig. 18), mas não formam a placa quitinosa e negra encontrada em *U. neivai* Lop. e *U. provecta* Lop.

Larva do 2.º estádio :

*Labial* : base muito robusta onde esta incorporado o *supra-labial.* A extremidade apical é fortemente sinuosa (fig. 22 -a).

*Dentado* : reduzido e produzido anteriormente em faixas que se continuam pelos canalículos que guarnecem o *atrium* (fig. 22 -b).

A margem ventral do primeiro segmento torácico tem espinhos fortes na margem interna (fig. 22 -ad).

*Infra-hipostomal* muito fortemente pigmentado e facilmente individualizavel. (fig. 22 -d). Visto pelo dorso tem a habitual forma em *H* (fig. 23 -d); entre os ramos anteriores se vê o *subhipostomal* que nesta espécie tem forma de anel dorsalmente incompleto (fig. 23-*f*). Esta peça, vista de perfil, está situada entre o *labial* e o *infra-hipostomal*. (fig. 22 -f).

*Hipostomal* representado por uma peça delgada unida ao *faringeal* e localizada sobre o *infra-hipostomal* (fig. 22 -g).

*Faringeal* : com os ramos posteriores dorsais divididos profundamente em duas partes (fig. 24 -h).

*Dorsofaringeal* : bem constituido, unindo os ramos dorsais do *faringeal* (fig. 22 -i).

Cultivadas em Agar soro de cavalo, Campinas, Estado de Goiaz.

*Udamopyga neivai* Lopes, 1940

(Figs. 26 a 30)

Larva do 1.º estádio :

*Pseudocéfalo* : com formações em faixa na face ventral que se continuam pelo *atrium* onde são unidas ao *dentado*.

*Labial*: extremidade apical muito robusta e pouco curva. Na base, não só o *dentado* como o *supra-labial* se encontram intimamente incorporados em uma só peça (fig. 26 -a). O *dentado*, visto de perfil, deixa ver o início das faixas quitinosas do *atrium* e da face ventral do *pseudocéfalo*. A base do *labial* se prolonga até o *hipostomal* em dois longos apêndices que demonstram a presença do *supra-labial*, aí incorporado (fig. 28 -c).

A margem ventral do primeiro segmento torácico (fig, 26-ad) se torna, nesta espécie, muito quitinizada e pigmentada fortemente. Nesta região se forma uma placa de contornos nítidos que se invagina até a margem do segmento seguinte. A sua constituição é facilmente percebida quando se examinam as margens da placa onde são vistos espinhos bem desenvolvidos. Conclue-se deste exame que, a reunião dos espinhos encontrados em *Paraphrissopoda chrysostoma* (Wied.) e mais acentuadamente em *Udamopyga setigena* (End.), se torna mais íntima e a região tem intensa pigmentação. Esta mesma formação é encontrada em *Titanogrypa larvicida* (Lopes) e em *Sarconeiva larvivorax* (Lopes) onde tem maior desenvolvimento e se articula ao esclérito *labial* por uma peça impar deste setor que acreditamos ser o anel mandibular muito modificado. Em qualquer destes casos esta peça forma, com o esclérito *labial*, um forte orgão preensor.

*Setor hipostomal* : encontram-se todas as peças intimamente unidas entre si e ao esclérito *faringeal*. A forte pigmentação dificulta a individualização das peças. No entanto, um atento exame, em posição dorsal, deixa ver que o esclérito *infra-hipostomal* está situado entre os ramos do *hipostomal* (figura 28 -d) e entre aqueles ramos se divisa o *subhipostomal* (fig. 28 -f). Visto de perfil o *hipostomal* mostra uma saliência, evidentemente correspondente ao *infra-hipostomal*, abaixo da qual desemboca o canal das glândulas salivares.

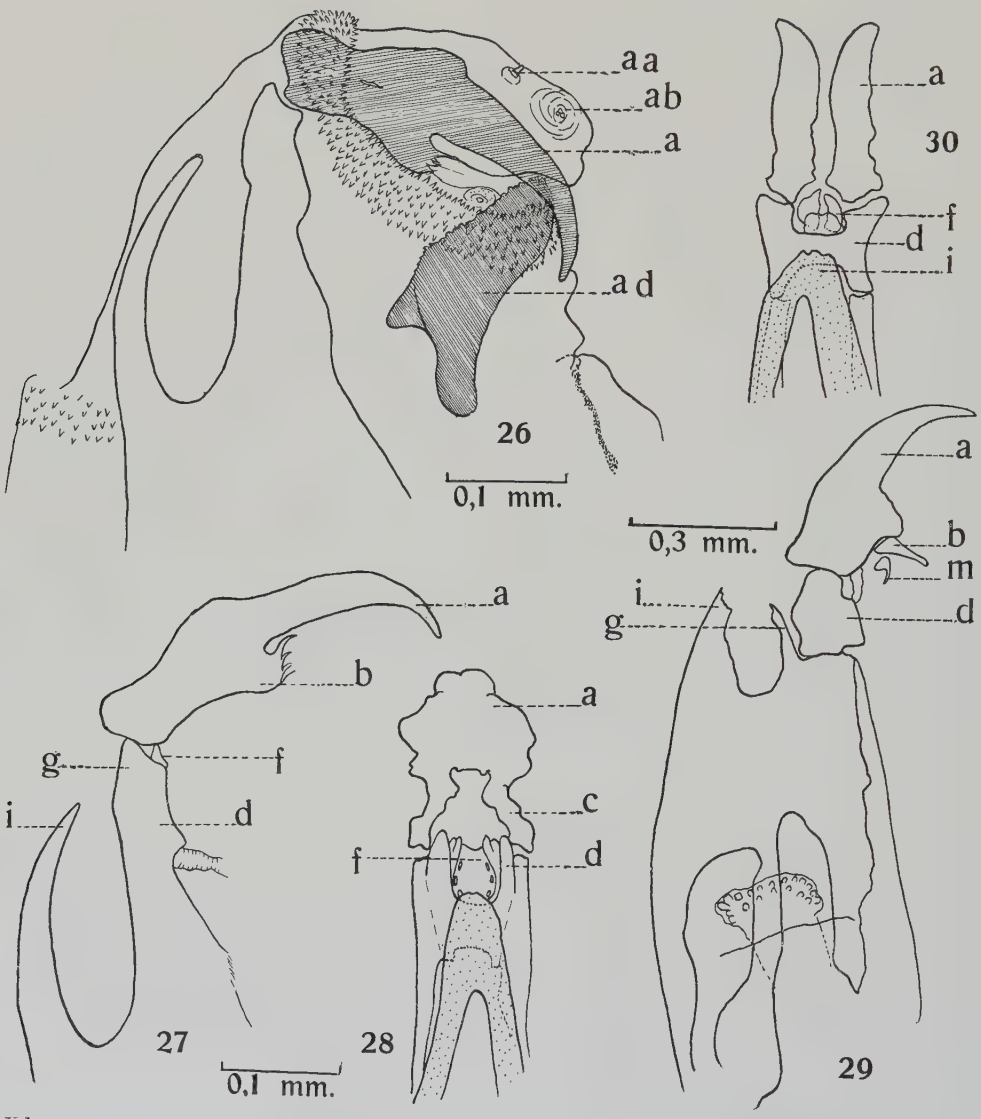
*Setor faringeal* : o *dorso-faringeal* é bem constituido e une superiormente os ramos anteriores dorsais do *faringeal* (fig. 27 -i).

Larva do 3.º estádio :

Pseudocéfalo membranoso em toda a extensão. Canalículos muito numerosos na face ventral e no *atrium*. Margem ventral do primeiro segmento torácico com numerosos espinhos.

*Labial* : bem constituido, curto (fig. 29 -a).

*Dentado* : pequeno e alongado, bem individualizado (fig. 29-b).




*Udamopyga neivai* Lopes, 1940 — Fig. 26: extremidade anterior da larva I, vista lateral; — Fig. 27: esqueleto cefálico da larva I, vista lateral; — Fig. 28: esqueleto cefálico da larva I, vista dorsal; — Fig. 29: esqueleto cefálico da larva III, vista lateral; — Fig. 30: esqueleto cefálico da larva III, vista dorsal. (Para a legenda das figuras veja página 163).

*Supra-labial* : incorporado ao *labial* havendo uma região mediana fracamente quitinosa (fig. 30-c).

Anel mandibular forte com um reduzido prolongamento ventral fracamente quitinoso (fig. 29-m).

*Língua* arredondada na extremidade livre.

Infra-hipostomal forte (fig. 30-d), normalmente constituido em forma de *H*. *Sub-hipostomal* entre os ramos anteriores do *H* formado por uma placa dorsal perfurada e duas placas ventrais (fig. 30-f).

Faringeal bem quitinizado, ramo posterior dorsal profundamente fendido e ramo ventral com fraca pigmentação. *Infra-faringeal* inteiramente despigmentado não sendo visiveis, em preparações totais, os canalículos da face ventral da luz esofageana (fig. 29). *Dorso-faringeal* bem desenvolvido, unindo dorsalmente os ramos dorsais anteriores do *faringeal* (fig. 30-i).

Larvas a 21-VIII-39 em carne, adultos a 21-IX-39, Grajaú.

*Oxysarcodexia angrensis* (Lopes, 1933)

(Figs. 31 a 41)

Larva do 1.º estádio :

*Pseudocéfalo* membranoso com ornamentação cefálica constituida por larga faixa transversalmente estriada. Esta faixa se inicia no esclérito *dentado* atravessa o *atrium* obliquamente dirigida para a extremidade anterior, faz uma forte curva para trás e se dirige para o dorso do segmento (fig. 31-ac, 32-ac).

*Labial* bem constituido, com 2 orifícios basais e alguns pontos pouco quitinizados (fig. 31-a).

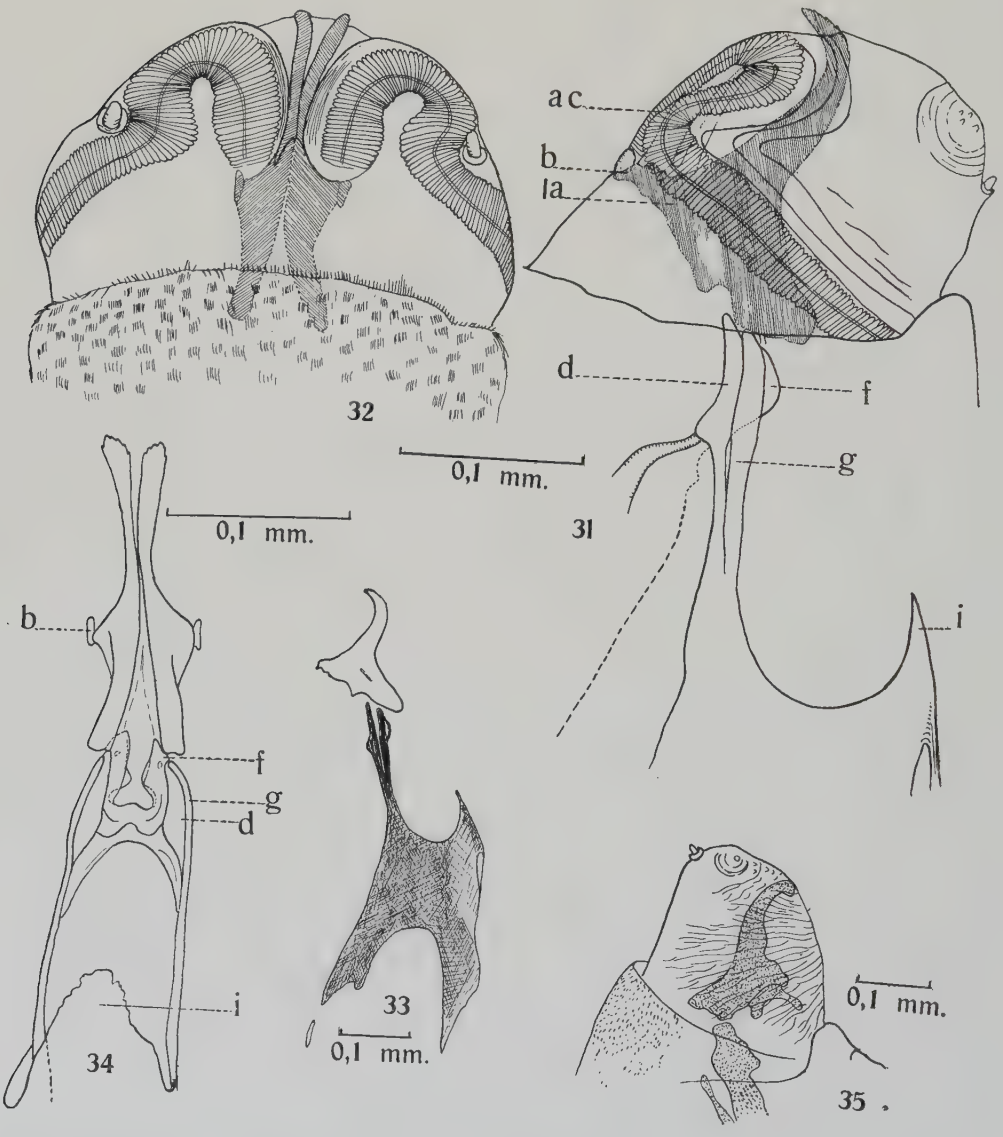
*Dentado* pequeno, muito pouco diferenciado do *labial* (fig. 31-b); mais notável visto de dorso, quando se destaca pela sua posição (fig. 34-b). *Supra-labial* não diferenciado.

*Setor hipostomal* bem diferenciado apesar de profundamente ligado ao *faringeal*. *Infra-hipostomal* longo, com uma saliência ventral arredondada onde vai desembocar o canal das glândulas salivares (fig. 31-d). *Hipostomal* longo e delgado, situado imediatamente acima do *infra-hipostomal*, com ele ligado ao *faringeal* posteriormente e articulado com o *labial* anteriormente. (fig. 31-g). *Sub-hipostomal* constituido por duas placas superiores bem quitinizadas e facilmente visiveis de perfil (fig. 31-f) e duas inferiores que constituem um anel incompleto nesta região do faringe situada imediatamente antes da trave mediana do *infra-hipostomal*.

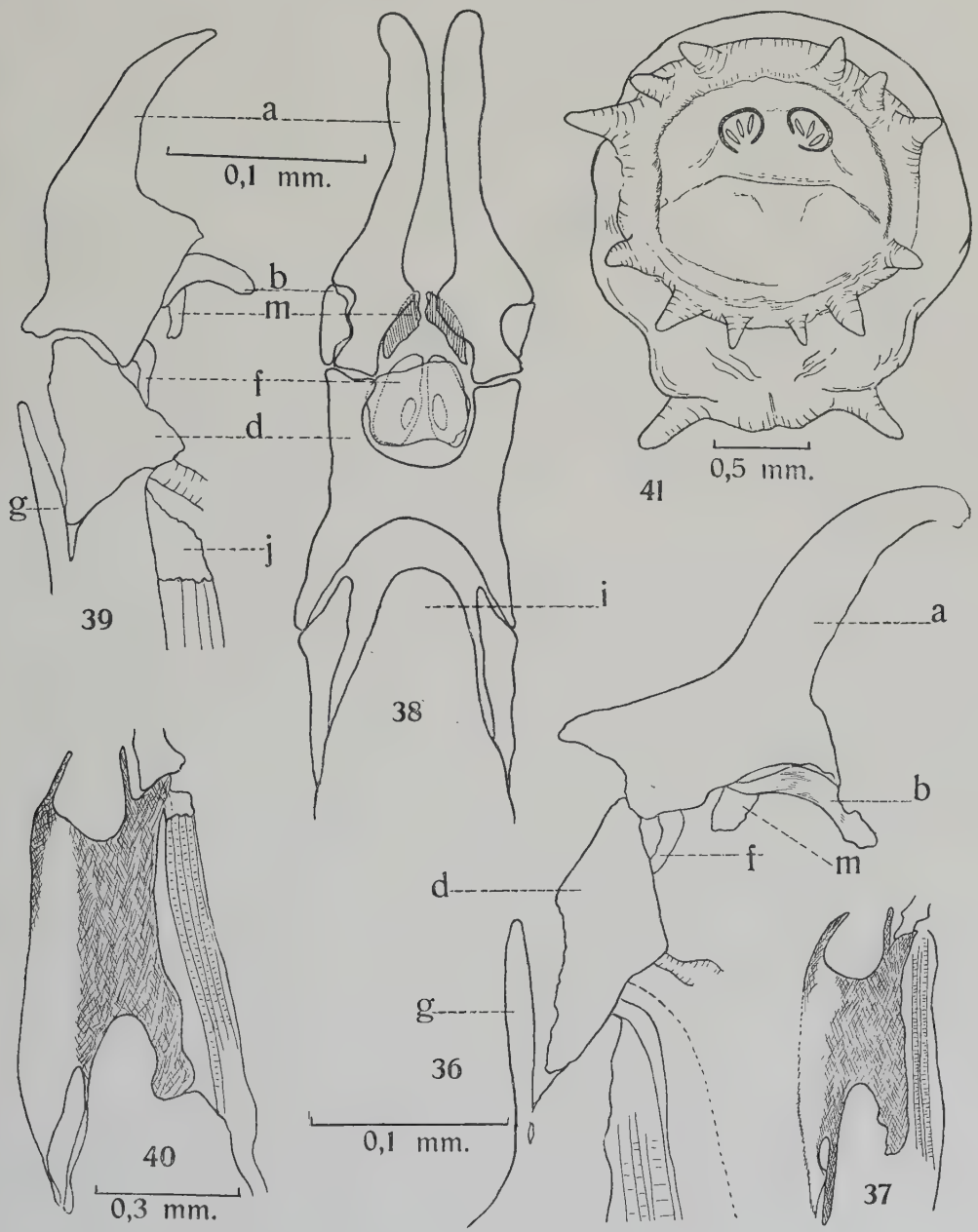
*Faringeal* bem pigmentado; *dorso faringeal* (fig. 33) bem separado do faringeal por zona de pouca pigmentação.

Larva do 2.º estádio :

*Pseudocéfalo* inteiramente membranoso. As formações em canal-culos se distribuem por toda a face lateral e pelo *atrium* (fig. 35).




*Oxysarcodexia angrensis* (Lopes, 1933) — Fig. 31: extremidade anterior da larva I, vista lateral; — Fig. 32: extremidade anterior da larva I, vista ventral; — Fig. 33: esqueleto cefálico da larva I, vista lateral; — Fig. 34: esqueleto cefálico da larva I, vista dorsal; — Fig. 35: extremidade anterior da larva II, vista lateral. (Para a legenda das figuras veja página 163).




*Oxysarcodexia angrensis* (Lopes, 1933) — Fig. 36: esqueleto cefálico da larva II, vista lateral; — Fig. 37: esclérito faringeal da larva II, vista lateral; — Fig. 38: esclerito cefálico da larva II, vista dorsal; — Fig. 39: esqueleto cefálico da larva III, vista lateral; — Fig. 40: setor faringeal da larva III, vista lateral; — Fig. 41: extremidde posterior da larva III, vista posterior. (Para a legenda das figuras veja página 163).

*Labial* muito forte, pouco curvo e com o ápice fracamente dentado (figura 36-a). As duas peças são separadas em toda a extensão (fig. 38-a). *Supra-labial* : incorporado ao *labial*.

*Dentado* : bem individualizado, alongado e curvo (fig. 36-b).

*Infra-hipostomal* : bem constituido, com a habitual forma em *H* (figura 38-d). *Hipostomal* longo e delgado, unido na base ao *faringeal* (figura 36-g). *Sub-hipostomal* constituindo um anel incompleto do qual a face dorsal tem uma placa única e é pouco quitinizado, ao passo que, ventralmente, há duas placas com grande orifício interno (fig. 38-f).

*Faringeal* : ramo posterior dorsal profundamente fendido, ramo ventral mais curto que o dorsal (fig. 37). O *infra-faringeal* não é visivel como esclérito individualizado. *Dorso-faringeal* unindo largamente os ramos dorsais do faringeal (fig. 38-i).

Larva do 3.º estádio :

*Pseudocéfalo* membranoso, canalículos muito numerosos nas faces laterais e no *atrium*. Antenas e palpos bastante salientes. Primeiro segmento torácico com espinhos robustos, principalmente no dorso; uniformemente distribuidos, nunca grupados, na margem ventral. Estigma anterior em leque com cerca de 11 orifícios.

Esqueleto cefálico muito semelhante ao do 2.º estádio. O *labial* é mais apontado e mais robusto (fig. 39-a). O setor *hipostomal* é constituido de modo idêntico. No setor *faringeal* aparece bem individualizado na sua parte anterior o *infrafaringeal* de onde partem os canalículos da face ventral do faringe (fig. 39-j). O *dorso faringeal* une largamente os ramos dorsais do *faringeal*.

Os estigmas posteriores estão situados em concavidade pouco profunda e as papilas são bem desenvolvidas (fig. 41).

As larvas que serviram a estas descrições são provenientes de Grajaú, Rio de Janeiro, cultivadas em carne. Larvas a 28-VII-41, pupas a 31-VII-41, adultos de 13 a 20-VIII-41.

*Oxysarcodexia amarali* (Prado & Fonseca, 1932)

(Figs. 42 a 46)

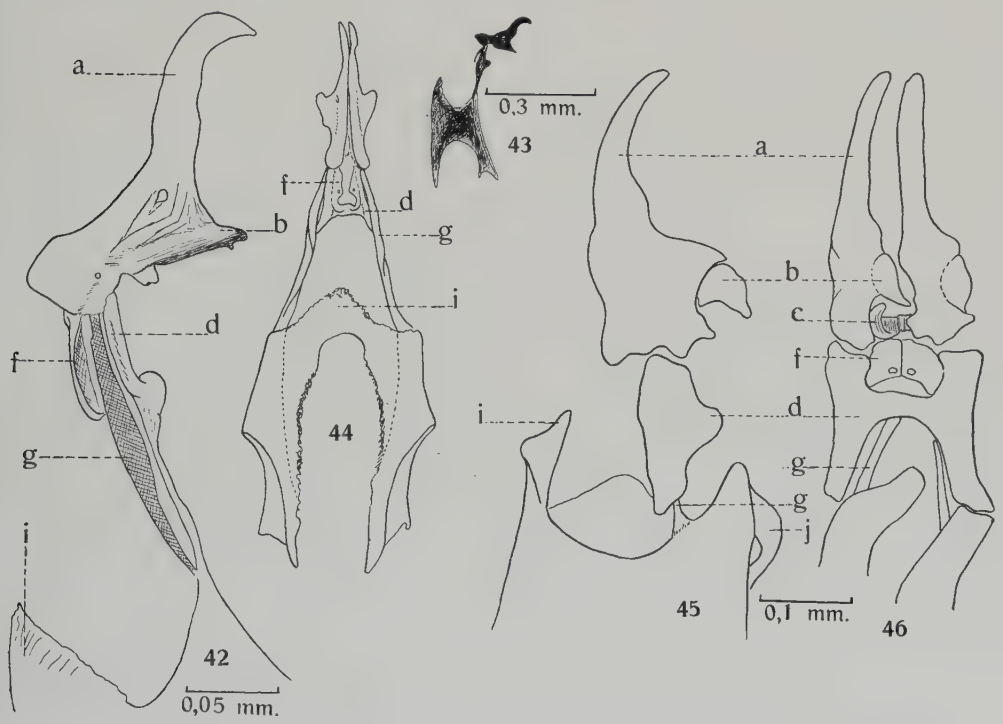
Larva do 1.º estádio :

*Pseudocéfalo* membranoso, com a curiosa ornamentação descrita para *O. angrensis* Lop. Há uma larga faixa transversalmente estriada que parte do *dentado* pelo *atrium*, dirige-se a princípio para a extremidade anterior, curva-se para baixo e depois segue uma direção oblíqua até a face dorsal.

*Labial* com larga base; a extremidade livre, a princípio reta, curva-se bruscamente no ápice (fig. 42-a). *Dentado* incorporado ao labial do qual é

separado apenas por uma zona de menor pigmentação (fig. 42-b). *Supra-labial* não individualizado.

*Hipostomal* longo e delgado, bem quitinizado, ocupando toda a região entre o *labial* e o *faringeal* (fig. 42-g) *Infra-hipostomal* delgado, medianamente engrossado (fig. 42-d). *Sub-hipostomal* visivel lateralmente, sendo a parte dorsal deste esclérito situada bem acima do *hipostomal* (fig. 42-f), inferiormente dividido em duas placas que teem perfurações (fi. 44-f).




*Oxysarcodexia amarali* Prado & Fonseca, 1932 — Fig. 42: extremidade anterior do esqueleto cefálico da larva I, vista lateral; — Fig. 43: esqueleto cefálico da larva I, vista lateral; — Fig. 44: esqueleto cefálico da larva I, vista dorsal; — Fig. 45: esqueleto cefálico da larva III, vista lateral; — Fig. 46: esqueleto cefálico da larva III, vista dorsal. (Para a legenda das figuras veja página 163).

*Faringeal* normalmente quitinizado, ramo dorsal não dividido. *Supra-faringeal* ligando largamente os ramos dorsais do *faringeal* por zona pouco quitinosa.

Larva do 3.° estádio :

*Labial* muito pigmentado, fracamente curvo para o ápice (fig. 45-a). *Dentado* bem individualizado, canalículos do *atrium* muito numerosos. *Supra-labial* constituido por duas peças dispostas transversalmente (fig. 46-c).

*Hipostomal* constituido por duas delgadas traves (fig. 46-g) situadas por dentro dos ramos laterais do *infra-hipostomal*. *Infra-hipostomal* normalmente constituido em *H*, muito pigmentado (fig. 46-d) visto lateralmente, apresenta forte apófise ventral onde se insere o canal das glândulas salivares. *Sub-hipostomal* constituido por duas peças em contacto que tem orifícios internos (fig. 46-f); lateralmente são encobertas pelos grossos ramos do *infra-hipostomal*.

*Faringeal* largo, forte. *Dorso faringeal* presente.

As larvas que serviram para estas descrições são provenientes de São Paulo (Capital), L. Travassos Filho col. Larvas a 23-XI-35, pupas a 30-XI-35 e adultos de 5 a 8-XII-35.

*Sarothromyia femoralis* (Schiner, 1868)

(Figs. 47 a 52)

Hall, em 1932 (Ann. Ent. Soc. Amer. 25: 641-645, pl. I-II), descreve os estádios evolutivos de *Sarothromyia femoralis simplex* Aldrich, 1916. Encontramos diferenças bem notaveis entre as duas sub-espécies, especialmente no que se refere à ornamentação cefálica da larva do 1.º estádio a que Hall não faz menção e à forma do esqueleto cefálico da larva madura.

Esta espécie é somente encontrada, nos arredores do Rio de Janeiro, em praias onde se alimenta normalmente de substância orgânica animal em decomposição, depositada pelo mar. Criamos, com grande facilidade, duas gerações, em laboratório, alimentando as larvas com carne fresca.

Larva do 1.º estádio :

*Pseudocéfalo* membranoso com duas faixas transversais que partem do *dentado* e são ligeiramente curvas para diante no *atrium*, dirigem-se para o dorso do segmento nas faces laterais. Das margens anteriores destas faixas partem pequenos sulcos perpendiculares ao grande eixo das faixas (fig. 47). Antenas bem constituidas.

*Labial* reto com o ápice curvo, notando-se na base regiões onde a quitinização é pouco intensa. *Dentado* alongado, incorporado, em parte, ao *labial*. *Supra-labial* não diferenciado.

*Infra-hipostomal* ligado posteriormente ao *hipostomal* (fig. 47-d). *Hipostomal* longo e delgado, unido na base ao *faringeal*. *Sub-hipostomal* pouco diferenciado, sendo mais notável a sua placa dorsal (fig. 47-f). *Setor faringeal* pouco quitinizado, *dorso-faringeal* bem unido anteriormente.

O esôfago apresenta um grande papo dorsal que, de início, é delgado e depois muito largo, ultrapassando a margem posterior do 5.º segmento abdominal da larva.

Larva do 3.º estádio :

*Pseudocéfalo* membranoso, canalículos numerosos partem do *atrium* e se espalham pelas faces laterais. Na extremidade anterior, entre os palpos e os ganchos bucais, o tegmento tem estrias muito profundas que, de perfil, dão à região um aspecto espinhoso.

*Labial* bem constituido, um tanto curvo no ápice (fig. 50-a). *Dentado* robusto, inferiormente apontado (fig. 50-b). O anel quitinoso imcompleto é bem constituido e formado por duas placas dispostas obliquamente (fig. 50-m).

*Infra-hipostomal* fortemente pigmentado, de forma sub-triangular, com o ângulo ventral bastante saliente, onde desemboca o conduto das glândulas salivares (fig. 50-d). *Hipostomal* longo e delgado. *Sub-hipostomal* com a placa ventral fracamente dividida em duas partes por uma faixa de menor quitinização, com orifícios internos; a placa dorsal desta peça é muito fracamente pigmentada e quase imperceptivel. (fig. 52-f).

*Faringeal* quitinizado intensamente, com o ramo posterior dorsal profundamente fendido. O *infra-faringeal* é bem constituido anteriormente onde dá lugar a formação dos canalículos da face ventral da luz faringeana. O *dorso-faringeal* é muito pequeno, mas bem pigmentado e seus ramos laterais se unem anteriormente (fig. 51).

Os estigmas respiratórios posteriores estão situados em região fracamente côncava. Esta cavidade é transversalmente alongada, as papilas são bem desenvolvidas, sendo que as inferiores medianas estão em plano diferente das inferiores laterais. No pupário esta cavidade desaparece tornando-se uma região plana, onde estão situados os estigmas. Hall, 1932, propõe a criação de uma subfamília baseada neste gênero por causa deste carater.

Foram capturadas fêmeas desta espécie no Recreio dos Bandeirantes, Rio de Janeiro que deram larvas a 2-XI-1936, pupas a 9-XI-1936 e adultos a 19-XI-1936. A 2.ª geração começou com larvas a 3-XII-1936, pupas a 12-XII-1936 e adultos a 28-XII-1936. As larvas foram alimentadas em carne fresca.

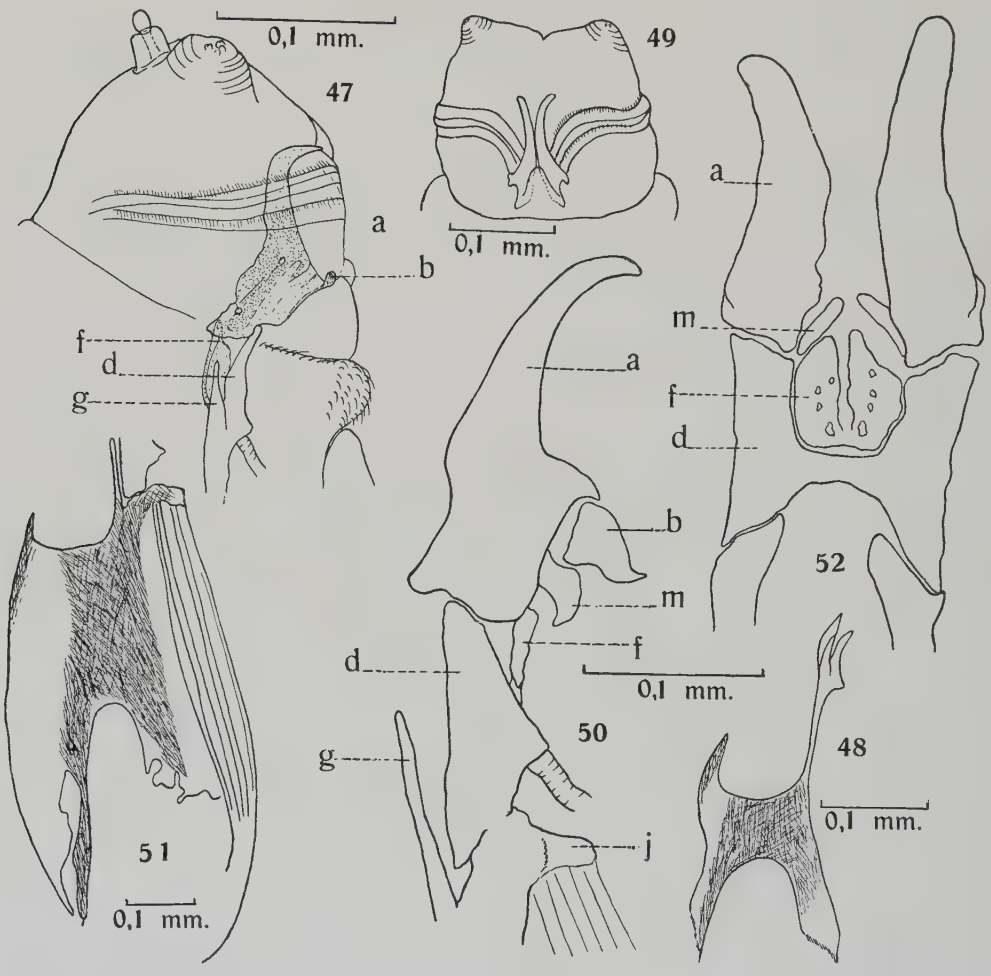
*Titanogrypa larvicida* (Lopes, 1935)

(Figs. 53 a 65)

Larva do 1.º estádio:

*Pseudocéfalo* : Toda a região dorsal, lateral e uma faixa ventral que alcança a margem do *atrium* apresenta forte quitinização, formando uma cáp-

sula muito pigmentada (fig. 56-ae). Abaixo desta faixa há ainda duas outras faixas não pigmentadas (fig. 56-ac) que limitam uma região côncava em forma de calha, que se insinua pelo *atrium* e vae terminar no *dentado*. Há ainda,




*Sarothromyia femoralis* (Schiner, 1868) — Fig. 47: extremidade anterior da larva I, vista lateral; — Fig. 48: setor faringeal da larva I, vista lateral; — Fig. 49: pseudocéfalo da larva I, vista ventral; — Fig. 50: esqueleto cefálico da larva III, vista lateral; — Fig. 51: setor faringeal da larva III, vista lateral; — Fig. 52: esqueleto cefálico da larva III, vista dorsal. (Para a legenda das figuras veja página 163).

lateralmente e abaixo destas faixas, uma região onde se encontram grandes espinhos situados em tuberculos (fig. 56). Somente a parte superior do *pseudocêfalo*, onde se encontram as antenas e os palpos, permanece numbranosa.

Na margem do *atrium*, onde terminam as faixas ventrais da cápsula quitinosa há um par de orgãos sensoriais situados tambem em região pigmentada.

Na margem ventral do 1.º segmento torácico se formam, pela reunião de espinhos, três grandes placas fortemente quitinosas (figs. 54-ad, 55-ad). A placa mediana está em contacto com uma forte peça quitinosa (fig. 54-m) que se articula com o *labial*, no ponto em que o *dentado* foi incorporado àquele esclérito. Esta peça, pela sua posição, deve representar o anel quitinoso que precede o esclérito *infrahipostomal*. Formam estas peças um conjunto articulado de forte poder preensor.

*Labial* com a extremidade livre curva e apontada (fig. 53-a). O par de escléritos está fortemente unido na base e na região mediana (fig. 57). *Dentado* unido intimamente ao *labial*, formando uma apófise deste, reconhecivel facilmente porque dele partem as faixas quitinosas e canaliculadas do *atrium*. *Supra-labial* unido ao *labial*, visivel como apófises dorsais do esclérito principal. (fig. 57-c).

*Infra-hipostomal* e *hipostomal* intimamente unidos de modo a formarem uma peça em *H* (fig. 59-d). Em vista lateral percebe-se uma convexidade ventral abaixo da qual desemboca o canal das glândulas salivares e, dorsalmente, se distingue uma outra saliência que está justaposta ao esclérito dorso-faringeal (fig. 53-g) que deve representar a principal porção do *hipostomal*. Posteriormente não se nota a soldadura do setor *hipostomal* ao *faringeal*. O *sub-hipostomal* é bem visivel lateralmente (fig. 53-f) e está situado entre os ramos superiores da forte peça em *H*.

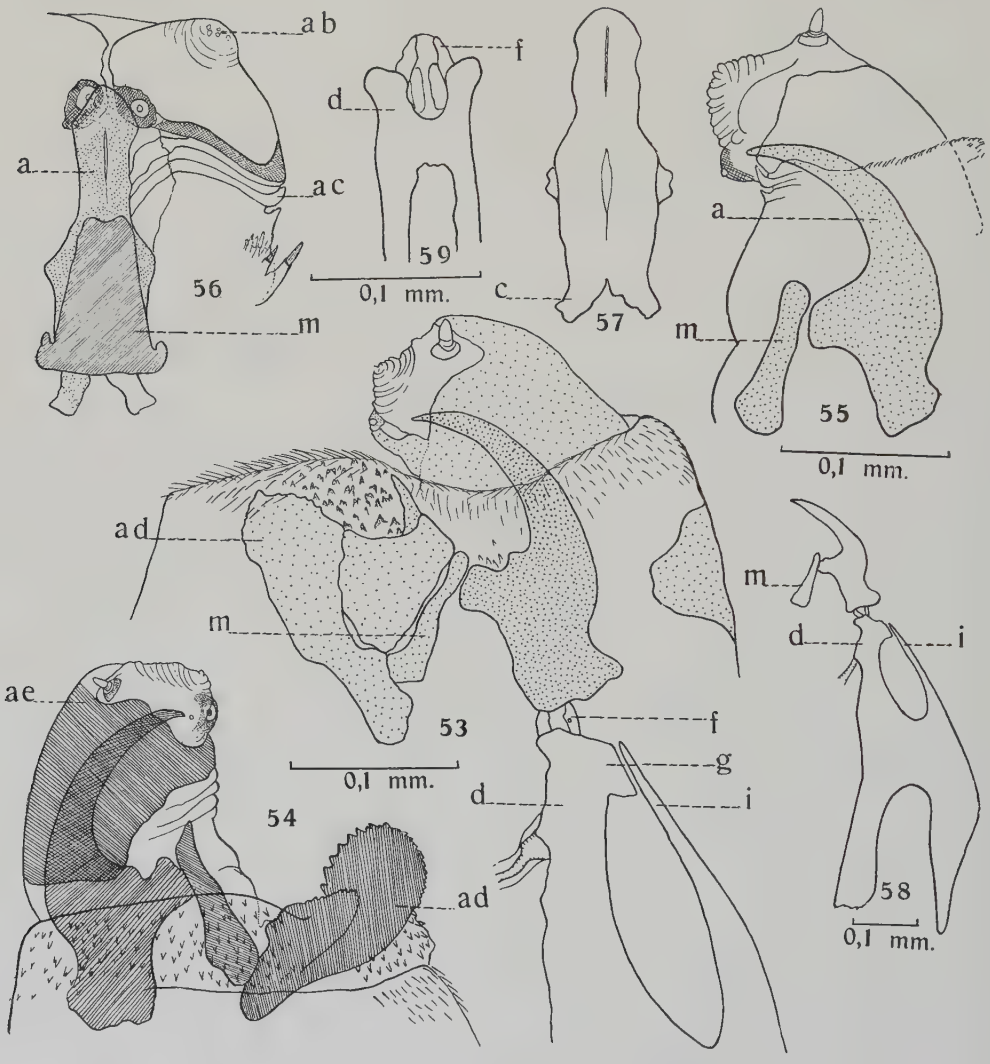
*Faringeal* fortemente pigmentado, ramos posteriores bem constituidos e sem subdivisões (fig. 58-h). *Dorso-faringeal* muito alongado, atingindo o ápice do setor *hipostomal;* seus ramos anteriores são unidos.

Larva do 2.º estádio :

*Atrium* e face ventral do *pseudocéfalo* com formações canaliculadas abundantes que se originam no esclérito *dentado*. Todo o *pseudocéfalo* é membranoso. *Labial* muito robusto na base, extremidade livre curta e pouco curva (fig. 60-a). *Dentado* pequeno mas bem individualizado (fig. 61-b). *Supra-labial* fortemente ligado ao *labial*, mas facilmente reconhecivel quando visto de dorso (fig. 62-c). Anel quitinoso visivel lateralmente (fig. 61-m).

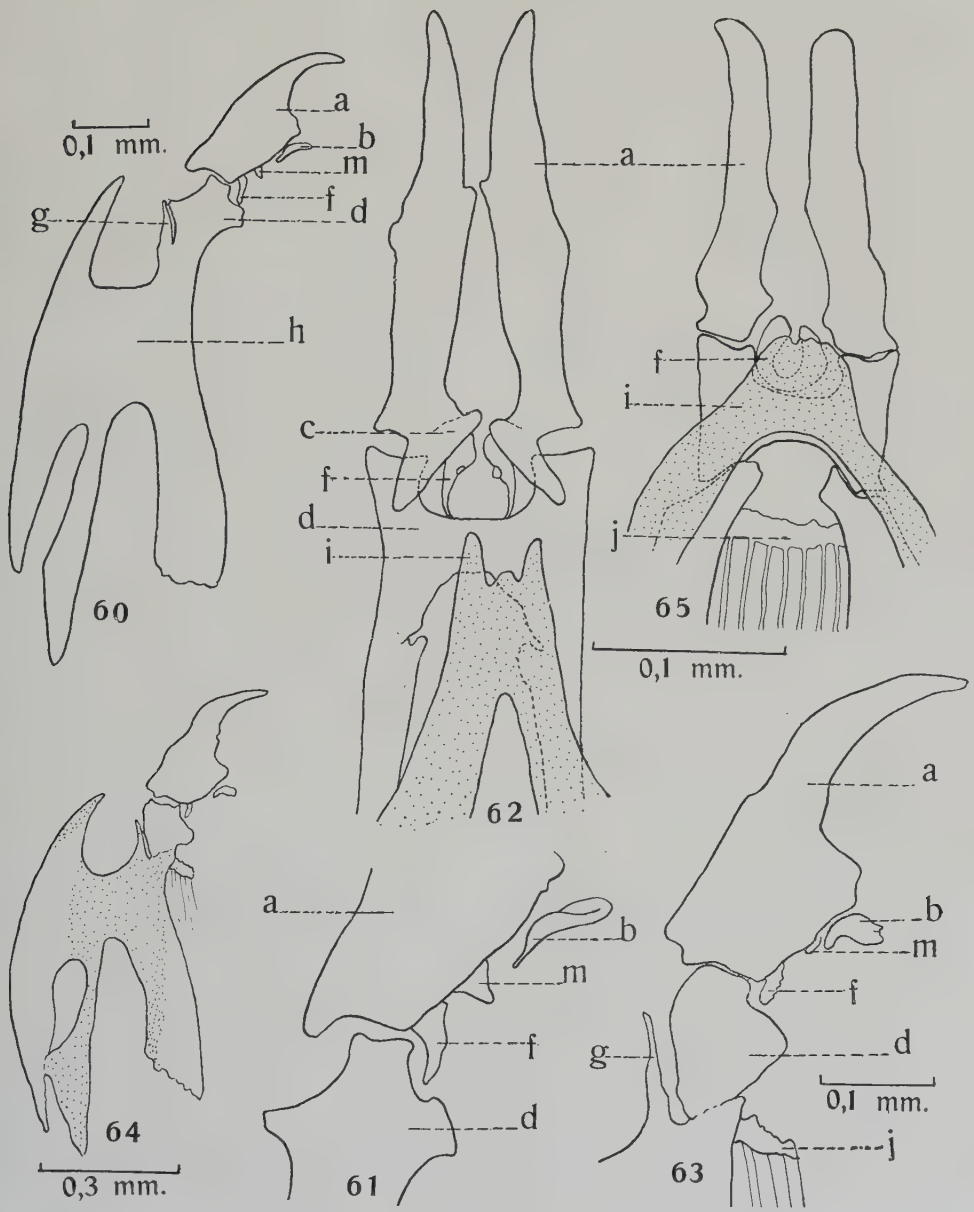
*Infra-hipostomal* grande, bem individualizado, largamente unido ao *faringeal*, com prolongamento ventral curto e largo onde se insere o canal das glândulas salivares (fig. 60-d). *Hipostomal* pouco desenvolvido, unido for-

temente ao *faringeal*, constituido em trave de extremidade anterior adelgaçada (fig. 60-g). *Sub-hipostomal* bem constituido, formando duas placas laterais (fig. 62-f).




*Titanogrypa larvicida* (Lopes, 1935), larva I — Fig. 53: extremidade anterior em repouso, vista lateral; — Fig. 54: extremidade anterior, orgãos preensores afastados; — Fig. 55: extremidade anterior; — Fig. 56: pseudocéfalo, vista ventral; — Fig. 57: esclérito labial vista dorsal; — Fig. 58: esqueleto cefálico, vista lateral; — Fig. 59: setor hipostomal, vista dorsal. (Para a legenda das figuras veja página 163).

*Faringeal* bem pigmentado, com o ramo posterior dorsal fendido fortemente (fig. 60-h). Dorso-faringeal com ramos laterais largamente unidos (fig. 62-i).




*Titanogrypa larvicida* (Lopes, 1935) — Fig. 60: esqueleto cefálico da larva II, vista lateral; — Fig. 61: setor hipostomal da larva II, vista lateral; — Fig. 62: esqueleto cefálico da larva II, vista dorsal; — Fig. 63: esqueleto cefálico da larva III, vista lateral; — Fig. 64: esqueleto cefálico da larva III, vista lateral; — Fig. 65: esqueleto cefálico da larva III, vista dorsal. (Para a legenda as figuras veja página 163).

Larva do 3.º estádio :

*Labial* robusto com a extremidade anterior pouco curva (fig. 63-a). *Dentado* bem constituido (fig. 63-b). *Supra-labial* inteiramente incorporado ao *labial* não sendo individualizado nem perceptivel, mesmo quando se observa pelo dorso (fig. 65).

*Infra-hipostomal* muito robusto (fig. 63-d). Visto pelo dorso, tem forma em *H* com ramos curtos (fig. 65-d). *Sub-hipostomal* em anel incompleto, situado entre os ramos anteriores do *infra-hipostomal* (fig. 65-f). *Hipostomal* pequeno, delgado e pouco estreitado anteriormente (fig. 63-g).

*Faringeal* quitinizado, principalmente na parte mediana, com o ramo posterior dorsal profundamente fendido (fig. 64). *Dorso-faringeal* com ramos laterais largamente unidos (fig. 65-i). A extremidade anterior do *infra-hipostomal* é bem pigmentada (fig. 63-j) e dela partem os canalículos da parede ventral do faringe.

As larvas do 1.º estádio foram obtidas por dissecção de uma fêmea capturada no Grajaú, Rio de Janeiro em 8-V-1941; as do 2.º e 3.º estádios de cultura obtida no Jardim Botânico, Rio de Janeiro em agosto de 1935.

*Townsendimyia halli* (Engel, 1931)

(Figs. 66 a 69)

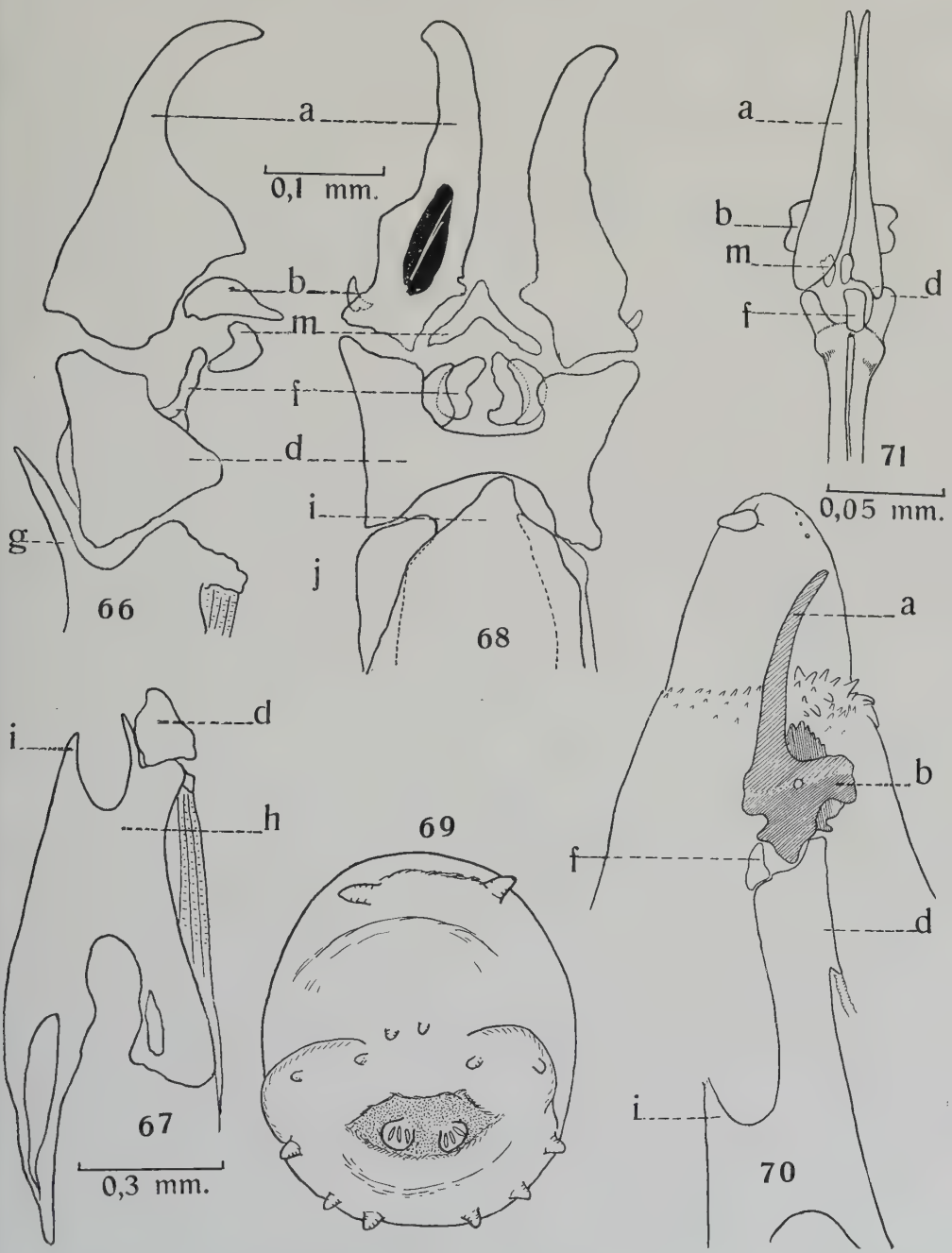
Larva do 3.º estádio :

*Labial* bem constituido, curvo apicalmente (fig. 66-a). *Dentado* estreito e alongado (fig. 68-d) de onde partem muitos canalículos para o *atrium* e faces laterais do *pseudocéfalo*. *Supra-labial* não diferenciado. Anel quitinoso bem nitido e em forma de *V* invertido. (fig. 68-m).

*Infra-hipostomal* grosso e muito pigmentado (fig. 66-d). *Hipostomal* longo, delgado, de ápice apontado e fortemente unido, pela base, ao *faringeal*. Sub-hipostomal constituido por um anel incompleto com duas placas pequenas dorsais muito separadas e duas placas ventrais maiores (fig. 68-f).

Setor *faringeal* com o esclérito principal bem constituido, com o ramo posterior dorsal mais longo que o ventral. *Infrafaringeal* notavel na extremidade anterior apenas (fig. 66-j).

O papo é bem constituido. A extremidade posterior tem pequenas papilas, as superiores em série, as medianas inferiores em plano diverso das laterais; cavidade estigmática reduzida mas muito profunda (fig. 69).




*Townsendimyia halli* (Engel, 1931), larva III — Fig. 66: esqueleto cefálico, vista lateral; — Fig. 67: setor faringeal, vista lateral; — Fig. 68: esqueleto cefálico, vista dorsal; — Fig. 69: extremidade posterior da larva. *Lepidodexia sarcophagina* (Townsend, 1926) — Fig. 70: extremidade anterior, vista lateral; — Fig. 71: esqueleto cefálico, vista dorsal. (Para a legenda das figuras veja página 163).

Três culturas desta espécie foram obtidas em São Paulo (Capital) pelo Dr. Lauro Travassos Filho: larvas a 12-4-1937, adultos a 28-4-1937. Larvas a 1-9-1937, pupas a 11-9-1937, adultos a 9-10-1937. Larvas a 31-5-1934, adultos a 29-6-1934.

Esta espécie é muito frequente em São Paulo (Capital) e nunca foi encontrada no Rio de Janeiro. Por gentileza do meu amigo e colega Fred. Lane recebi larvas em tubo com agar-soro e criei esta espécie no Rio de Janeiro durante cinco gerações. As primeiras larvas foram obtidas de uma única fêmea a 22-III-1940 e deram adultos a 16-IV-1940. Os adultos da 2.ª geração nasceram a 20-V-1940, os da 3.ª a 28-VI-1940, os da 4.ª a 30-VII-1940 e os da 5.ª a 6-IX-1940.

*Lepidodexia sarcophagina* (Townsend, 1926)

(Figs. 70 a 71)

Larva do 1.º estádio:

*Pseudocéfalo* muito estreitado, antenas longas e bem constituidas. Há algumas papilas no lugar dos palpos que não formam um orgão bem localizado (fig. 70).

*Labial* com extremidade livre longa e quase reta (fig. 70-a). *Dentado* inteiramente incorporado ao *labial*, parecendo constituir grande parte deste. Internamente o *dentado* tem um prolongamento em placa, anteriormente denteada (fig. 70-b). *Supra-labial* não individualizado. Anel quitinoso constituido por duas placas pequenas arredondadas (fig. 71-m).

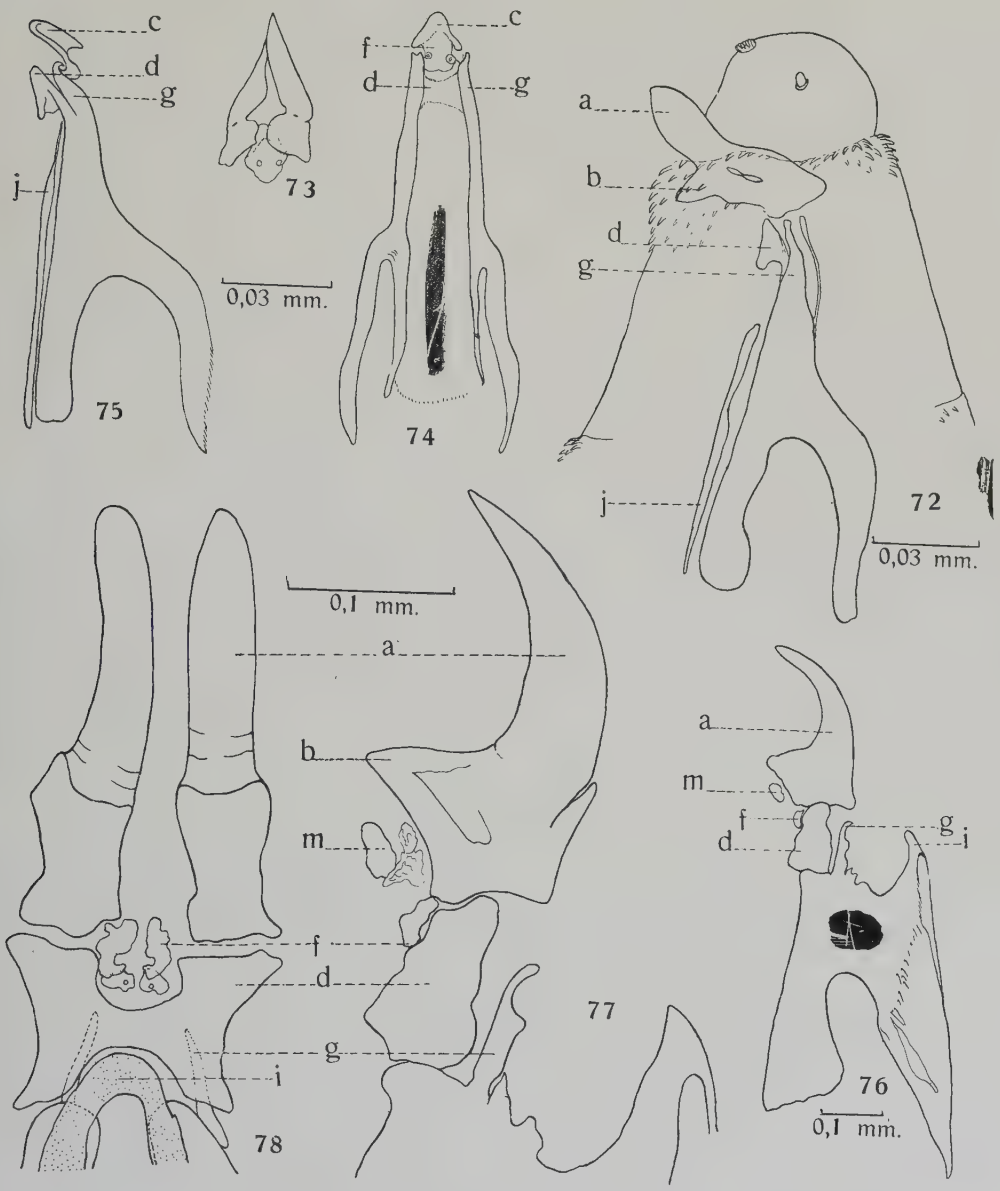
Setor *hipostomal* completamente fundido ao *faringeal*. Visto lateralmente se destaca uma peça muito pigmentada que representa a parte dorsal do *sub-hipostomal* (fig. 70-f). Acreditamos ser esta peça o que Townsend denomina o *supra-hipostomal*. O *infra-hipostomal* apresenta ventralmente uma saliência onde desemboca o canal das glândulas salivares (fig. 70-d). Visto pelo dorso este esclérito se destaca como duas apófises anteriores (fig. 71-d). Não só no setor *hipostomal* como no setor *faringeal* as peças laterais estão extraordinariamente aproximadas. O *dorso-faringeal* é rudimentar e seus ramos laterais não se unem superiormente.

*Protodexia* sp.

(Figs. 72 a 78)

Larva do 1.º estádio:

*Pseudocéfalo* inteiramente membranoso, sem formações especiais. Antenas e palpos bem constituidos.




*Protodexia* sp. — Fig. 72: extremidade anterior da larva I, vista lateral; — Fig. 73: setor labial da larva I, vista dorsal; — Fig. 74: setores hipostomal e faringeal da larva I, vista dorsal; — Fig. 75: setores hipostomal e faringeal da larva I, vista lateral; — Fig. 76: extremidade anterior da larva III, vista lateral; — Fig. 77: extremidade anterior do esqueleto cefálico da larva III, vista lateral; — Fig. 78: esqueleto cefálico da larva III, vista dorsal.
(Para a legenda das figuras veja página 163).

*Labial* com extremidade anterior achatada, larga, terminando em ponta (fig. 72-a). Vistos pelo dorso estes escléritos são afastados na base e teem os ápices convergentes (fig. 73-a). *Dentado* ligado ao *labial*, havendo uma zona de separação demarcada por dois orifícios medianos e aproximados (figura 72-b). *Supra-labial* encaixado na base do *labial* e fortemente unido à extremidade anterior do *sub-hipostomal*.

*Hipostomal* com a larga base inteiramente soldada ao *faringeal* gradualmente estreitado na extremidade anterior (fig. 72-g).

*Infra-hipostomal* muito pigmentado, bem destacado do *hipostomal* ao qual é ligado por uma membrana (fig. 72-d). *Sub-hipostomal* bem visivel na sua parte dorsal (figs. 72-f, 74-f).

*Faringeal* normalmente pigmentado com os ramos posteriores simples (fig. 72-h). *Infra-faringeal* constituido em longa e delgada trave que ocupa toda a face ventral do *faringeal* (fig. 72-j). *Supra-faringeal* inteiramente ausente.

Larva do 3.º estádio :

*Labial* fortemente quitinizado, com a extremidade anterior fracamente curva, cilíndrica (figs. 77-a, 78-a). *Dentado* inteiramente incorporado ao labial (fig. 77-b). *Supralabial* ausente. Anel quitinoso constituido por placas de pouca quitinização de margens mal definidas (fig. 77-m).

*Hipostomal* delgado com a parte anterior curvada dorsalmente (figura 77-g). *Infra-hipostomal* muito pigmentado, com a base inteiramente soldada ao *faringeal*, disposto sob o *hipostomal* do qual é largamente separado (figs. 77-d, 78-d). *Sub-hipostomal* formado por quatro placas de pouca quitinização e bordos pouco definidos, duas dorsais e duas ventrais (fig. 78-f).

*Faringeal* largo e bem constituido, ramo posterior ventral fortemente quitinizado, ramo dorsal mais longo que o ventral, com regiões largamente despigmentadas. *Supra-faringeal* unindo ramos dorsais anteriores do *faringeal* (figs. 76-i, 78-i). *Infra-faringeal* inteiramente ausente.

As larvas desta espécie, obtidas de uma única fêmea capturada no Jardim Botânico, Rio de Janeiro, foram criadas até o 3.º estádio em baratas (*Periplaneta americana*). Larvas do 1.º estádio foram colocadas no abdome das baratas a 16-IX-1935 e no dia 24-IX-1935 uma larva do 3.º estádio foi encontrada, quando dissecamos uma barata morta acidentalmente. Não conseguimos adultos.

*Musca domestica* L., 1758

(Figs. 79 a 90)

Larva do 1.º estádio :

*Pseudocéfalo,* na face ventral, com numerosos espinhos que se apresentam fortemente pigmentados na margem do *atrium*. Estes espinhos se dispõem com pouca regularidade. Atrás dos espinhos se encontram três profundos sulcos transversais (fig. 79). Antenas e palpos bem constituidos.

*Labial* largo, apenas pigmentado na extremidade anterior onde há um grande dente e outros menores (fig. 79-a). A base do *labial* se une ao *hipostomal*. *Dentado* pouco definido, representado por zona pigmentada atrás do *atrium*. O *labial* está colocado muito posteriormente em relação ao *atrium* e ao *dentado*. Anel quitinoso representado por duas regiões pigmentadas alongadas, atrás da língua.

*Hipostomal* constituido por uma longa e delgada trave que une o *labial* ao *faringeal* (fig. 80-g). *Infra-hipostomal* bem quitinizado, vendo-se nitidamente o canal das glândulas salivares que se une à sua extremidade posterior (fig. 79-d). Entre os ramos do *infra-hipostomal* percebe-se uma zona fracamente pigmentada que representa o *sub-hipostomal* (fig. 81-f).

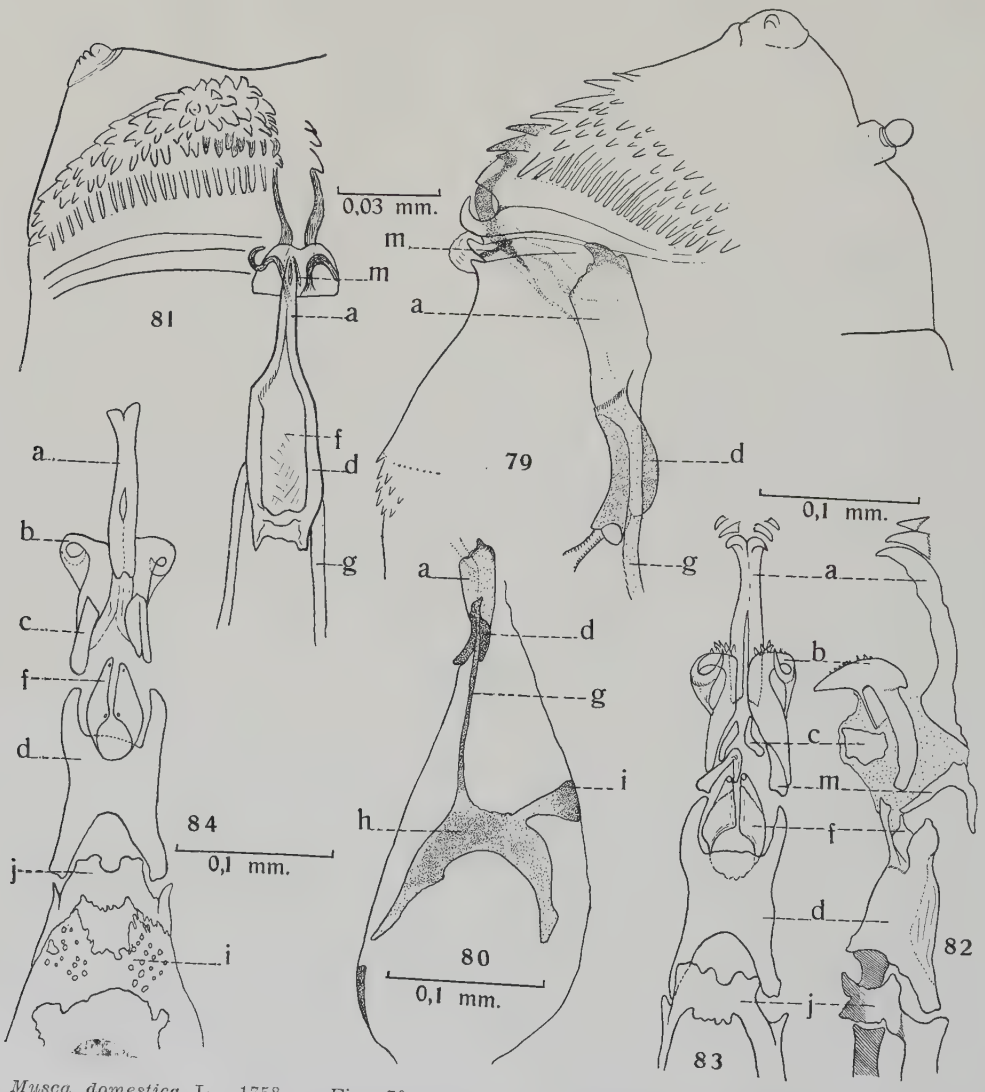
*Faringeal* largo, ramos posteriores delgados e fortemente divergentes (fig. 80-h). *Suprafaringeal* bem constituido, unindo dorsalmente as placas faringeanas (fig. 80-i).

Larva do 2.º estádio :

*Labial* longo e pouco curvo, fracamente quitinoso na base, muito pigmentado na extremidade anterior (fig. 82-a). Constituido por dois ramos laterais unidos medianamente. *Dentado* de forma muito caracteristica : visto de perfil, há uma região em forma de arco de círculo, cuja superfície apresenta espinhos; esta região está unida a uma trave, fortemente quitinosa, que alcança o meio do *supralabial* (fig. 82-b). A região anterior onde estão situados os espinhos, forra lateralmente o *atrium* e apresenta um prolongamento curvo que se dirige para a linha mediana e para cima (figs. 83-b, 87-b). *Supra-labial* constituido por duas peças em forma de *V* invertido cujos ramos ventrais estão apoiados na peça dorsal do esclérito *sub-hipostomal* (figs. 82-c, 83-c).

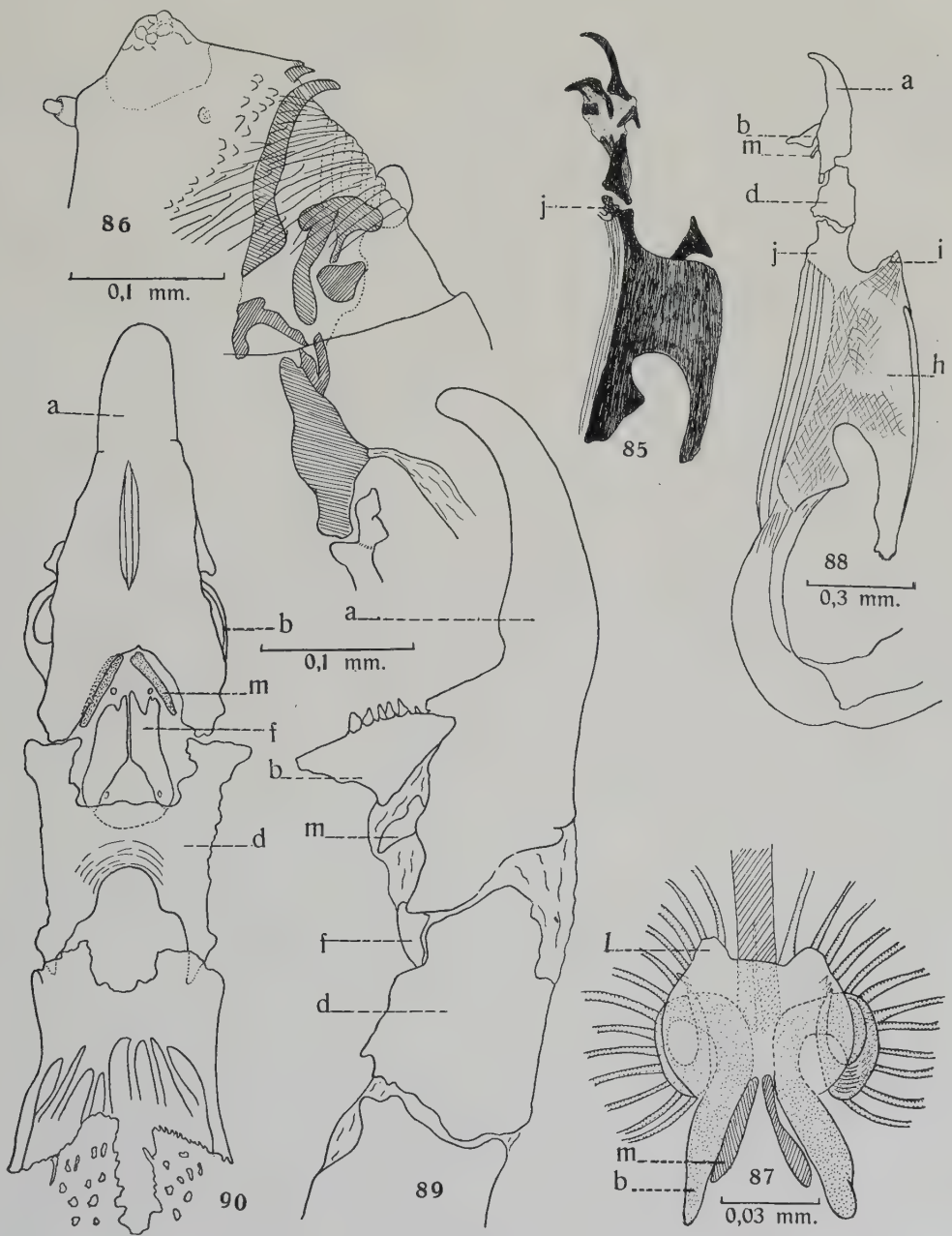
*Infra-hipostomal* se apresenta como uma forte peça de contorno irregular (fig. 82-d). Vista ventralmente tem forma de *H* (fig. 83-d). Dorsal-

mente apresenta uma região de menor pigmentação que deve representar o vestigio do *hipostomal. Sub-hipostomal* situado entre os ramos anteriores do




*Musca domestica* L., 1758 — Fig. 79: extremidade anterior da larva I, vista lateral; — Fig. 80: esqueleto cefálico da larva I, vista lateral; — Fig. 81: extremidade anterior da larva I, vista ventral; — Fig. 82: esqueleto cefálico da larva II, vista lateral; — Fig. 83: esqueleto cefálico da larva II, vista dorsal. (Para a legenda das figuras veja página 163).

*infra-hipostomal;* é constituido por uma placa dorsal e outra ventral, ambas divididas longitudinalmente na linha mediana de modo a se formarem quatro peças (fig. 82-f, 83-f).




*Musca domestica* L., 1758 — Fig. 85: esqueleto cefálico da larva II, vista lateral; — Fig. 86: extremidade anterior da larva II, vista lateral; — Fig. 87: atrium da larva II; — Fig. 88: esqueleto cefálico da larva III, vista lateral; — Fig. 89: esqueleto cefálico da larva III, vista lateral; — Fig. 90: esqueleto cefálico da larva III, vista dorsal. (Para a legenda das figuras veja página 163).

*Faringeal* fortemente pigmentado, sem ramo anterior dorsal. *Dorso-faringeal* muito bem individualizado e mais pigmentado que a região do *faringeal* onde se insere (fig. 85-i); visto dorsalmente se notam orifícios inteiramente hialinos (fig. 84-i). *Infrafaringeal* constituido apenas na extremidade anterior, unindo os ramos ventrais do *faringeal* (fig. 82-j).

Larvas do 3.º estádio :

*Labial* forte, muito pigmentado, fortemente curvo (fig. 89-a). As duas placas são soldadas intimamente de modo a constituir um gancho único com indicação mediana de sutura (fig. 90-a). *Dentado* sub-triangular, bem individualizado, com a face anterior munida de fortes espinhos curtos (fig. 89-b). *Supra-labial* não diferenciado. Anel quitinoso constituido por duas pequenas peças alongadas e obliquamente situadas (fig. 90-m).

Setor *hipostomal* fortemente pigmentado, o esclérito *hipostomal* não é diferenciado do *infra-hipostomal* que parece ocupar quase toda a região e tem a forma característica em *H* (fig. 90-d). O *sub-hipostomal* é formado por duas placas trapezoidais, fracamente separadas na linha mediana.

O *faringeal* é fortemente pigmentado e o ramo dorsal posterior é mais longo e menos pigmentado que o ramo ventral. O *dorso-faringeal* é pouco extenso mas une largamente os ramos anteriores do *faringeal* (fig. 88-i). Do esclérito *infra-faringeal* só permanece quitinizada a região anterior (fig. 88-j) de onde partem os canalículos ventrais da luz faringeana.

As larvas foram criadas, em alfafa molhada durante várias gerações, em laboratório.

## SUMMARY

The author publishes a comparative study of eleven species of Sarcophagid flies and gives a redescription of the larval stages of *Musca domestica* L. as a model.

The work was made upon material obtained from *Sarcophagidae* reared in the Laboratory. Some of them were parasitic flies from Insects and other invertebrates. *Protodexia* was reared using the domestic cockroach (*Periplaneta americana*) instead of the *Orthroptera* or *Mantodea* its true hosts. The larvae obtained by dissection of female abdomen was reared in flesh or agar-horse serum. The last proceeding is very good since the skins of all larval stages can be conserved for study and it is possible to observe the ecdyses. Some of the larvae prefer dead snails (*Bulimulus* and *Fruticicola*) and is able to destroy larvae of other species found in the same molluscs. The first stage maggot can be obtained by dissections of dried female specimens and

furnishes very good characters to determine the species and establish the philogenetical relationship of the genera in the family. The pseudocephalon presents very curious ornaments or grooves in some species (*Oxysarcodexia*). Sometimes there is a pigmented capsula covering a great part of the pseudocephalon (*Titanogrypa*). The cephaloskeletal sclerites have a peculiar shape and constitution for every species, mainly in the first stage maggot.

## LEGENDA DAS FIGURAS

*a* — esclérito labial; *b* — dentado; *c* — supralabial; *d* — infra-hipostomal; *f* — sub-hipostomal; *g* — hipostomal; *h* — faringeal; *i* — dorso-faringeal; *j* — infra-faringeal; *l* — língua; *m* — anel quitinoso ventral; *o* — luz do faringe; *p* — saco dorsal esofagiano; *q* — esofago; *r* — proventrículo; *s* — cecuns do intestino médio; *t* — glândulas salivares; *u* — conduto das glândulas salivares; *v* — alça esofagiana anterior; *x* — atrium; *a a* — antena; *a b* — palpo; *a c* — faixas quitinosas do atrium; *a d* — esclérito quitinoso ventral do primeiro segmento torácico, formado pela reunião dos espinhos cutâneos; *a e* — cápsula quitinosa do pseudocéfalo.

# Estudos preliminares sobre a doença de Chagas na Bolivia (*)

por

Emmanuel Dias e Rafael A. Torrico M.

(Com 1 estampa, 5 figuras)

*Introdução*

As investigações sobre a doença de Chagas na Bolívia acham-se ainda no período inicial. Alí apenas se conhece a existência dos transmissores intermediários, que em alguns lugares foram encontrados naturalmente infectados por flagelados. A infecção humana, ou mesmo os reservatórios animais do parasito, ainda não foram assinalados, mas sua existência pode ser considerada certa, em vista da presença do hematófago domiciliar infectado. Com sua constatação, que virá cedo ou tarde, será mais uma vez confirmado o aforisma de Chagas e a história da tripanosomose nesse país repetirá a de outros, onde o encontro da doença humana tem tardado anos após a verificação do hemíptero parasitado pelas formas evolutivas do *S. cruzi*.

Assim, julgamos oportuno divulgar, se bem que certamente com falhas, os presentes conhecimentos sobre a distribuição dos barbeiros na Bolívia e de seu grau de infecção, no intuito de facilitar a orientação de futuras pesquisas relativas à infecção humana e animal, a realizar-se de preferência nas localidades com elevada percentagem de triatomas contaminados, já que esta pode muito bem ser considerada como expressão de um verdadeiro xenodiagnóstico natural (Dias, 1936). Faremos tambem sucinto estudo morfológico e biológico de amostras de *Schizotrypanum* obtidas de *vinchucas* procedentes do Departamento de Cochabamba.

*Transmissores*

Antes mesmo que extensivos inquéritos sejam levados a cabo nesse país vizinho, pode avaliar-se a grande difusão dos insetos transmissores da doença de Chagas, que tanto nas regiões de clima tropical como nas temperadas encontram condições de vida excelentes no tipo predominante de ha-

* Recebido para publicação a 18 de janeiro e dado à publicidade em abril de 1943.

bitação rústica dos campezinos. O principal vector é o *Triatoma infestans*, como em outras repúblicas vizinhas e em certas regiões do Brasil. Alem do *Triatoma infestans* há mais três espécies referidas na literatura como presentes na Bolívia : o *Triatoma sordida*, o *Triatoma venosa* e o *Rhodnius pictipes* (*).

No mapa anexo estão indicadas as localidades que pudemos determinar, pela pesquisa bibliográfica ou por exame de material correspondente, como seguramente infestadas por barbeiros. Na literatura que rapidamente consultamos apenas pudemos encontrar menção às seguintes localidades com *T. infestans* : Chulumani (Yungas de La Paz), Veintemillas, 1931; Coroico, Chulumani e Tupiza, Mazza & Jörg, 1940; Sococha, Neiva, 1941; e Charagua, Martins & Macedo, 1942. A existência do *T. sordida* em Coroico foi precisada por Mazza & Jörg, 1938. (*).

Graças à grande gentileza dos Drs. F. L. Soper e F. A. Kerr, a Divisão de Estudos de Endemias recebeu o seguinte material colecionado e montado por técnicos da Fundação Rockefeller :

*Triatoma infestans* — Departamento de Cochabamba (Mizque, Pojo, Omereque, Campero, Chalcani); Dept. de Santa Cruz (Cotoca, Cercado, Montero, Gutierrez, Lagunillas, Pampa Grande, San Antônio); Dept. de Chuquisaca (Yguembe, Rosario del Ingre, Hucaya, Cuevo); Departamento de La Paz (Chulumani, Coroico); Dept. de Potosi (Sococha, Nazareno, Suipacha); Dept. de Tarija (Vila Montes). *Triatoma sordida* : Dept. de Santa Cruz (San Javier).

Recebemos ainda *Triatoma infestans* das localidades de Cercado, Punata e Arque, do Departamento de Cochabamba, por intermédio do Dr. José Rosa Torrico M.

*Infecção natural*

Veitemillas (1942) refere que o encontro de Vinchucas naturalmente infectadas por *S. cruzi* foi por ele primeiro efetuado na Bolívia, em Chulumani, Yungas de La Paz (Veitemillas, 1931). Em 1916 Artur Neiva, examinando *T. infestans* procedentes de Socoche, verificou em quase todos a existência de flagelados (Neiva 1941); mas a espécie não figura como naturalmente infectada no país na Sinopse dos Triatomídeos de Neiva & Lent (1941).

Recentemente Martins & Macedo (1942) notificaram a infecção em 77,2 % do 22 *T. infestans* que examinaram, provenientes de Charagua, Santa Cruz.

(*) V. apendice..

O material que nos foi dado estudar é todo procedente do Departamento de Cochabamba, das localidades de Cercado, Punata e Arque. Devemo-lo, como já deixamos consignado, à gentileza do Dr. J. R. Torrico. Constava de 362 exemplares de *T. infestans,* dos quais 278 chegaram mortos e 84 vivos (alem de inúmeros ovos). Conteudo intestinal dos insetos vivos, eliminado espontaneamente após sucção ou obtido por punção retal, foi examinado a fresco, observando-se a presença de flagelados em 44 (52,4 %). A discriminação dos barbeiros por procedência, fase evolutiva e resultado do exame encontra-se no quadro abaixo.

REMESSAS DE "TRIATOMA INFESTANS" RECEBIDAS DE COCHABAMBA

| | CERCADO, JUNHO 1942 | | | PUNATA, OUTUBRO 1942 | | | ARQUE, OUTUBRO 1942 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Posit. | Neg. | Mortos | Posit. | Neg. | Mortos | Posit. | Neg. | Mortos |
| Machos | 0 | 0 | 7 | 7 | 3 | 65 | 1 | 0 | 39 |
| Fêmeas | 3 | 5 | 6 | 14 | 8 | 69 | 3 | 0 | 36 |
| Ninfas | 1 | 3 | 16 | 14 | 15 | 21 | 0 | 0 | 9 |
| Larvas | 0 | 0 | 0 | 1 | 6 | 6 | 0 | 0 | 4 |

Dentre os exemplares adultos de *T. infestans* que recebemos de Cochabamba, alguns havia que chamavam a atenção pela largura exagerada do conexivo e tambem pelas asas relativamente muito curtas, terminando a certa distância da extremidade posterior do abdome.

Preparações coradas foram feitas com dejeções dos insetos mais infectados, mostrando os parasitos aspecto semelhante ao das formas de critídia e de tripanosoma metacíclico do *Schizotrypanum cruzi.*

*Isolamento do parasito*

Amostras de *Schizotrypanum* foram obtidas em animais, por inoculação de dejeções de *T. infestans,* naturalmente infectados de Cercado e de Punata. Seguem-se algumas observações de animais infectados.

a) *T. infestans* de Cercado, Cochabamba:

Cobaias 1.662 e 1.663, inoculadas em 8-7-1942 com dejeções, ficando ambas positivas a fresco 13 dias depois. Os tripanosomas aumentaram rapidamente no sangue. A 1.662 morreu em 11-8-42, encontrando-se nos esfregaços e cortes de coração formas de leishmania intracelulares; em 30-7-42 fora sugada por diversos barbeiros normais (*P. megistus* e *T. infestans*)

que adquiriram intenso parasitismo (dissecção 17-8-42, 24-9-42, 6-10-42). A cobaia 1.663 foi sacrificada em 25-7-42, fazendo-se várias passagens (camondongos 1.693-1.694, cobaia 1.695).

1693 — Positivo com 13 dias, apresentando infecção escassa e irregular, tornando-se negativo; sua observação já dura mais de cinco meses.

1.694 — Nunca teve exame a fresco positivo. O xenodiagnóstico, contudo, foi positivo em 26-8-42 com *Rhodnius prolixus;* os dois últimos insetos foram dissecados em 26-12-42, mostrando-se bastante parasitados e com abundantes formas metacíclicas.

1.695 — Positiva no 12.º dia, sofrendo infecção crescente que terminou pela morte em 28-9-42. Diversos *T. infestans* e *R. prolixus* que a sugaram infectaram-se.

Cobaia 1.775 — Foi inoculada em 6-10-42 com *T. infestans* que sugou a cobaia 1.662 em 30-7-42. Exames a fresco positivos de 30-12-42 a 18-12-42, estando viva.

Camondongos 1.660 e 1.661 — No dia 3-7-42 foram inoculados com dejeções de barbeiros. Um deles nunca teve exame positivo, o outro teve apenas um, muito tempo depois de injetado.

Cobaia 1.708 — Dejeções contaminadas foram depositadas na mucosa ocular, em 6-8-42. Todos os exames a fresco foram negativos, bem como dois xenodiagnósticos, praticados em 31-8-42 e 18-9-42. Em 19-9-42 foi reinoculada com sangue de cobaia 1.695, mostrando tripanosomas no sangue 23 dias mais tarde. Infecção escassa e irregular. Vive, tendo tido último exame positivo em 14-12-42. Deste animal foi obtida cultura em Noguchi.

*b*) *T. infestans de Punata.*

Cobaia 1.811 — Inoculação com dejeções em 21-10-42, positivo 5-11-42 e morte em 10-11-42.

Cobaia 1.862 — Inoculada com dejeções em 11-11-42, teve primeiro exame positivo 9 dias depois, morrendo em 23-11-42.

Camondongo 1.864 — Inoculado juntamente com o animal anterior, ficou positivo no mesmo dia e teve infecção progressiva. Os tripanosomas tornaram-se muito numerosos no sangue, sendo o camondongo sacrificado, bastante mal, em 29-11-42, fazendo-se passagem de seu sangue para dois camondongos (1.899-1.900) que nove dias depois tinham parasitos no sangue ao exame a fresco.

Estes breves protocolos mostram que as amostas de *Schizotrypanum* isoladas de *T. infestans* da Bolívia são de virulência bastante apreciavel,

tendo a cobaia se mostrado mais regularmente sensivel do que o camondongo branco. Mostram ainda que por xenodiagnóstico nos animais inoculados obteve-se o desenvolvimento do parasito nas espécies *T. infestans, P. megistus* e *R. prolixus.*

*Morfologia*

Para o estudo morfológico e biométrico das amostras bolivianas em questão foram desenhados à câmara clara e medidos 150 tripanosomas do sangue de três animais, sendo cinquenta de cada: cobaia 1.662, camondongo 1.864 e camondongo 1.889, respectivamente com 29, 19 e 15 dias de infecção.

Estas 150 formas medidas mostraram as seguinte dimensões, em micra:

| | *Mínima* | *Máxima* | *Média* |
|---|---|---|---|
| Extremidade posterior-Meio do núcleo (P. N.).... | 4,2 | 10,3 | 7,6 |
| Meio do núcleo-Extremidade anterior (N. A.).... | 3,0 | 7,9 | 5,6 |
| Flagelo livre (Fl) ..... | 3,6 | 10,3 | 76 |
| Comprimento total (T.) ..... | 12,2 | 24,9 | 20,8 |

A distribuição de frequência de cada uma destas dimesões foi:

| μ | PN | NA | Fl | μ | T |
|---|---|---|---|---|---|
| 3 | — | 7 | 1 | 12 | 1 |
| 4 | 4 | 41 | 2 | 13 | — |
| 5 | 3 | 37 | 3 | 14 | 2 |
| 6 | 31 | 56 | 35 | 15 | 3 |
| 7 | 71 | 9 | 71 | 16 | 3 |
| 8 | 21 | — | 25 | 17 | 5 |
| 9 | 19 | — | 12 | 18 | 14 |
| 10 | 1 | — | 1 | 19 | 11 |
| | | | | 20 | 27 |
| | | | | 21 | 50 |
| | | | | 22 | 12 |
| | | | | 23 | 16 |
| | | | | 24 | 6 |

O índice nuclear médio foi de 1,357 ou seja praticamente 1,4.

O estudo biométrico das amostras bolivianas comparativamente com cutras amostras de *Schizotrypanum* será feito em próximo trabalho por E. Dias e Lincoln de Freitas Filho. Deste trabalho extraimos os dados relacionados com as amostras da Bolívia, dando a distribuição de frequência do índice nuclear por grupos de 0,5 e comparando-os entre si pelo teste do $\chi^2$, conforme um dos processos adotados pelos referidos autores.

## ÍNDICE NUCLEAR

Distribuição de frequência (grupos de 0,5)

| *Amostra* | 0,5-0,9 | 1,0-1,4 | 1,5-1,9 | 2,0-2,4 | 2,5-2,4 | *Total tripanosomas* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.662 . . . . | 2 | 26 | 19 | 2 | 1 | 50 |
| 1.864 . . . . | 1 | 33 | 13 | 3 | — | 50 |
| 1.899 . . . . | 2 | 37 | 10 | 1 | — | 50 |

Comparadas estas distribuições de frequência entre si pelo processo do $\chi^2$, os resultados mostraram a identidade biométrica da amostra de Cochabamba medida em cobaia (1.662), com as de Punata medidas em camondongos (1.864 e 1.899), e a destas entre si :

| | $\chi^2$ | n' | P |
|---|---|---|---|
| 1.662 e 1.864 ..... | 3,48 | 5 | .484952 |
| 1.662 e 1.899 ..... | 6,04 | 5 | .196618 |
| 1.864 e 1.899 ..... | 0,20 | 4 | .960251 |

Do trabalho de Dias e Freitas adiantamos ainda que amostras biometricamente idênticas às de *T. infestans* da Bolívia foram isoladas de homem (Venezuela), do morcego *Hemiderma perspicillatum* (Venezuela, Brasil) e de *Rhodnius prolixus* da Guiana Francesa.

## SUMÁRIO

Os autores estudam a distribuição dos triatomídeos na Bolívia, referindo as localidades em que já foram encontrados parasitados por flagelados e fornecendo dados sobre o grau de infecção de *Triatoma infestans* no Departamento de Cochabamba (Cercado, Punata e Arque).

Por inoculação de cobaias e camondongos brancos com dejeções de insetos contaminados, isolaram amostras virulentas de *Schizotrypanum*, cujas características morfológicas e biométricas precisam.

O parasito foi cultivado *in vitro* e foi conseguida sua evolução em barbeiros puros das espécies *Triatoma infestans, Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*.

Tanto quanto estão informados, até o presente só foram encontradas no país quatro espécies de barbeiro, a saber : *Triatoma infestans*, principal transmissor local da tripanosomose, *Triatoma sórdida, Triatoma venosa* e *Rhodnius pictipes* (v. apendice).

*Agradecimentos* — Os autores aproveitam o ensejo para agradecer a colaboração que lhes prestaram os Drs. J. R. Torrico, F. L. Soper e F. A. Kerr pela remessa de valioso material que tornou possivel a realização deste trabalho, e ao Dr. Cezar Pinto, pelas informações que lhes forneceu.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dias, E.

1936. Xenodiagnóstico e algumas verificações epidemiológicas na moléstia de Chagas. 9.ª Reunião da Soc. Argentina Patol. Reg. 1:89-119.

Martins, A. V. & Macedo, E.

1942. Nota sobre a moléstia de Chagas na Bolívia. Brasil Médico 56(33):392-393.

Mazza, S., & Jörg, M. E.

1938. Tercera nota sobre triatomidæ (Hemipt. Het. Reduvioidea) Argentinos. M.E.P.R.A. 36:26-58.

Mazza, S., & Jörg, M. E.

1940. Variabilidade del diseño somatico de *Triatoma infestans* Klug. M.E.P.R.A. 49:3-22.

Neiva, A.,

1941. Excursão cientifica ao norte da Argentina. Excertos de um diário, fevereiro a maio de 1916. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 56 pp. (V. p. 35).

Neiva, A. & Lent, H.

1941. Sinopse dos triatomídeos. Rev. Entomol. 12(1-2):61-92.

Pinto, C.

1938. Zooparasitos de interesse médico e veterinário. Pimenta de Mello & Cia., Rio de Janeiro (v. pág. 95).

Veintemillas, F.

1931. Las tripanosomiasis em Bolivia? Bol. Dir. Gen Sanidade 3(6).

Veintemillas, F.

1942. Algunas parasitosis crônicas en Bolívia. Comunicação à XI Conf. Sanit. Panam., Rio de Janeiro, setembro de 1942.

## APENDICE

Já se achava composta a presente nota quando os autores leram o trabalho de S. Mazza "Consideraciones sobre la enfermedad de Chagas en Bolivia", aparecido no número de 23 de dezembro de 1942 de La Prensa Medica Argentina (vol. 29, n. 51).

Do resumo do referido trabalho constam as seguintes indicações sobre a distribuição de barbeiros infectados no territorio boliviano:

*Triatoma infestans*: Departamento Potosi (Villazón, Yanalta, Sococha, Nazareno, Arenales, Tupiza, Balcarce, Suipacha); Dept. Tarija (Tarija, Jacuiba); Dept. Chuquisaca (Sucre, Jotaba, Camargo; Dept. Cochabamba (Cochabamba); Dept. La Paz, (La Paz, Coroico, Coripata, Chulumani, Irupana, Anazani, Villa La Fuente).

*Triatoma sordida*: Departamento La Paz (Nord e Sud Yungas).

*Triatoma oswaldoi*: Dept. Chuquisaca (Sucre). A espécie foi tambem encontrada em Tupiza, Dept. Potosí, porem nesta localidade não se mostrou infectada por flagelados.

*Psammolestes coreodes*: Tambem sem infecção, foi assinalado em ninhos de ave em Camiri, Dept. Chuquisaca, provincia Azero.

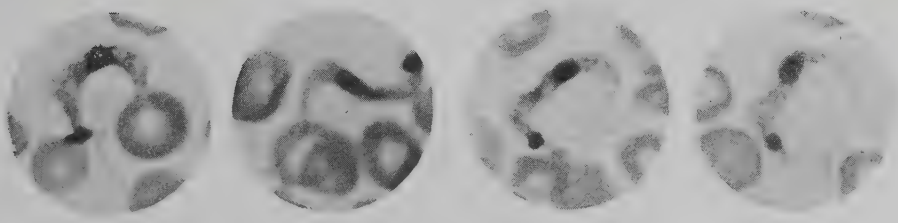
Infelizmente não foi possivel a substituição do mapa que apresentamos por outro mais completo, do qual constassem todos os dados referidos neste apendice.

---

**ESTAMPA 1**

Mapa da Bolívia indicando a distribuição geográfica dos triatomídeos (v. apendice).

Tripanosomas do sangue de animais experimentalmente infectados com amostras de *Schizotrypanum* isolados de *T. infestans* de Cercado e de Punata (Departamento de Cochabamba). x 1.700.



**Dias, E. & Torrico, R.:** Doença de Chagas na Bolivia

# Um novo "test" ponderal para a avaliação da atividade do hormônio cortical (*)

por

Gilberto G. Villela

(Chefe da Divisão de Química e Farmacologia do Instituto Oswaldo Cruz)

(Com 1 gráfico no texto)

MacKay e MacKay, em 1926, mostraram que a ablação de uma suprarrenal causa a hipertrofia da glândula restante (1). Havendo hipofisectomia esta hipertrofia não se verifica (Smith). No animal normal a ministração de extratos suprarrenais ativos, em doses elevadas, produz atrofia das suprarrenais conforme mostraram Ingle e Kendall (2) (3). A fração adrenotrópica dos extratos antehipofisários, no entanto, previne esta atrofia, o que faz supor ser a hipertrofia da glândula no animal adrenalectomizado unilateralmente a resultante do excesso do estímulo hipofisário não compensado.

MacKay e MacKay verificaram mais tarde que a injeção de extratos ativos de suprarrenal no animal operado, podia prevenir a hipertrofia da glândula restante (4). Se a dose do extrato for elevada resultará uma atrofia da glândula. O crescimento da suprarrenal parece estar condicionado ao estímulo hipofisário que é frenado pela quantidade de hormônio cortical em circulação no organismo. Desde que esse equilíbrio seja rompido aparece a hipertrofia.

Baseados nestas observações, procuramos estabelecer um ensáio da atividade dos extratos corticais que seria representado pela ação antihipertrofiante sobre a glândula não operada.

TÉCNICA

As operações foram feitas em ratos brancos (tipo Wistar) de peso variando entre 20 e 60 g. e da mesma criação de animais que nos servem

* Recebido para publicação a 8 de fevereiro e dado à publicidade em abril de 1943.

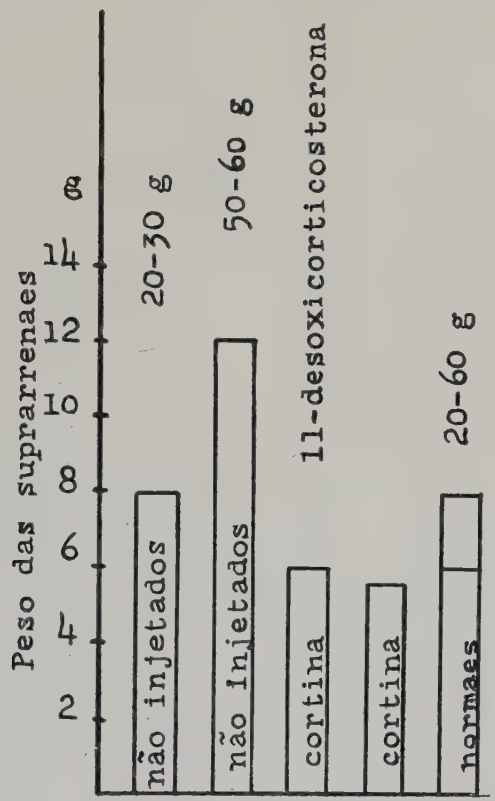
(*) Trabalho apresentado ao 2.º Congresso Brasileiro de Química reunido em Curitiba (janeiro de 1943).

habitualmente para o "test" de atividade. Estes respondem bem aos extratos corticais, apresentando uma sobrevida média de 7 dias depois da adrenalectomia total.

A adrenalectomia unilateral é feita em 10 a 20 ratos de peso uniforme (variando de 2 a 5 g.) e no mesmo lado. A técnica operatória é a que geralmente empregamos em nosso laboratório para o ensáio dos hormônios corticais (5). A anestesia é feita pelo eter anestésico, em dose mínima, depois do animal ter sido injetado com 0,1 a 0,12 cm3 da solução de veronal a 10%. A operação se pratica no prazo de 3 a 4 minutos, o animal estando já acordado quando se processa à sutura final. A glândula depois de retirada e livre da gordura que a envolve, é mergulhada na solução fixadora (6), onde permanece 12 a 15 horas. O líquido fixador é uma modificação do de Bouin e tem a seguinte composição :

| | |
|---|---|
| Solução saturada de ácido pícrico ..... | 750 cm3 |
| Aldeido fórmico comercial ..... | 150 cm3 |
| Ácido acetico glacial ..... | 100 cm3 |
| Uréia. . . . . | 10 g. |

Após 12 horas o orgão é bem seco em papel de filtro e pesado numa balança de torsão. O animal é injetado no mesmo dia da operação e nos dias consecutivos até o 8.º dia quando se retira pelo mesmo processo a glândula restante. Para cada lote de animais é conveniente a princípio usar dois lotes de testemunhas. Um deles é injetado com um extrato de valor conhecido ou com a 11-desoxicorticosterona e o outro não é injetado. Verifica-se que os animais não injetados apresentam ao cabo de 8 dias uma hipertrofia da glândula restante, ao passo que os animais que tomaram o extrato ativo mostram pesos pouco superiores aos da glândula retirada e comparaveis às glândulas do mesmo lado de animais não operados, mas do mesmo tamanho. E' importante assinalar aquí que o lote de ratos deve ser homogêneo, porque o peso da suprarrenal varia com o peso do animal. A princípio trabalhamos com ratos de 20 a 30 g., que são os que empregamos para o ensáio de Grollman, mas observamos que se obteem resultados mais nítidos quando se trabalha com ratos de 50 a 60 g. Nestes a diferença de peso das glândulas é sensivel e permite uma comparação bem mais nítida. No gráfico I encontram-se os valores obtidos com as glândulas de animais normais, injetados com extratos ativos e com a 11-desoxicorticosterona. O presente "test" pareceu-nos util sobretudo quando se tem em vista a avaliação da atividade de preparações farmacêuticas contendo outras substâncias tais como vitaminas e extratos tissulares diversos. Acresce ainda que os animais que serviram para o nosso "test" podem ser empregados para o ensáio de sobrevida ou da manutenção de peso.




A unidade ponderal por nós proposta é representada pela quantidade do hormônio cortical capaz de impedir a hipertrofia da glândula suprarrenal do rato de 50-60 g. adrenalectomizado unilateralmente e no prazo de 8 dias.

CONCLUSÕES.

A adrenalectomia unilateral do rato determina a hipertrofia da suprarrenal restante. A ministração de extratos corticais ativos impede essa hipertrofia.

E' proposto um "test" ponderal baseado na ação frenadora do hormônio cortical sobre o aumento de peso da suprarrenal do animal adrenalectomizado unilateralmente. A quantidade de hormônio suficiente para manter o peso da glândula e comparavel à do rato de mesmo peso e não operado, é considerada como uma unidade antihipertrófica.

## A NEW PONDERAL TEST FOR DETECTING THE ACTIVITY OF CORTICAL HORMONE EXTRACTS.

Unilateral adrenalectomy caused a marked hypertrophy of the remaining gland, as showed by MacKay and MacKay. In normal animals adre-

nal extracts produced the atrophy of the adrenal glands (Ingle and Kendall). The growth stimulus seems to be dependent from the adrenotropic hormone of the hypophysis. MacKay and MacKay showed later that active cortical extracts were able to prevent the pituitary stimulus in adrenalectomized rats. Based on these findings a biological test was worked out; the weight of the remaining adrenals of the operated rats being taken as a criterium for the activity of the cortical extracts injected.

Rats weighing 20 to 60 g were employed. Adrenalectomy was performed unilateraly and the extract injected the same day until the 8 th day. At this time the second gland was operated, dried and weighed. For each test, 3 groups of rats were employed, the first group was injected with the unknown extract,, the second with 0.5 mg. of 11-desoxycorticosterone and the third not injected. The weight of the adrenals of the rats of the third group showed a marked hypertrophy as compared with the other groups. The weight and size of the glands of the normal rats of the same age showed values comparable with those of the operated rats and injected with active extracts or 11-desoxycorticosterone. When younger rats were used (20 to 30 g) the differences are not very sharp as when older animals were employed (50 to 60 g).

The quantity of the hormone which is able to maintain the weight of the gland of the adrenalectomized rat at the same level as the weight of the nonoperated rat is proposed as 1 anti-hypertrophic rat unit.

BIBLIOGRAFIA

1. MacKay (E. M.) e MacKay (L. L.)
Jour. Exp. Med. 43, 395, 1926.

2. Ingle (D. J.) e Kendall (E. C.)
Science, 86, 245, 1937.

3. Ingle (D. J.)
Endocrinology, 31, 419, 1942.
Ingle (D. J.), Higgins (G. M.) e Kendall (E. C.)
Anat. Rec. 71, 363, 1938.

4. MacKay (E. M.) e MacKay (L. L.)
Endocrinology, 23, 237, 1938.

5. Villela (G. G.) e Quental (J. B.)
Hormônios, Liv. Odeon, Rio, 1938.

6. Burn (J. H.)
Biological Standardization, Oxford Medical Publications, 1937, p. 143.

# Presença de Panstrongylus megistus infectado por Schizotrypanum no Rio de Janeiro, D. F. (*)

por

Emmanuel Dias

(Com 2 figuras no texto)

Por comunicação do eminente entomologista Professor Angelo Moreira da Costa Lima, estavamos informado da existência do *Panstrongylus megistus,* um dos mais importantes transmissores da doença de Chagas, no bairro residencial de Santa Tereza, Capital Federal. Por diversas vezes o Dr. Luiz Moreira da Costa Lima, filho do ilustre Professor, apanhara em sua residência, um apartamento em luxuoso edifício á rua Almirante Alexandrino, exemplares adultos do mencionado inseto, que à noite chegavam voando, atraídos pela luz.

No dia 5 de dezembro último o Professor Costa Lima ofereceu-nos, por nímia gentileza, um especimen macho daquela procedência, que fora capturado vivo na ante-véspera e que morrera havia poucas horas. Retirando conteudo intestinal por punção retal, nele verificamos a presença de flagelados ainda perfeitamente moveis e relativamente numerosos, com a morfologia de critidia e de tripanosoma metacíclico. O exame de preparados fixados pelo alcool absoluto e corados pelo Giemsa mostrou tratar-se de parasitos com características de *Schizotrypanum,* aparentemente indiferenciaveis do *S. cruzi.*

Comunicado o fato ao Dr. Henrique Aragão, Diretor do Instituto Oswaldo Cruz, fomos enviado ao local com o Dr. G. Jansen em 8-12-1942, tendo-nos sido então entregues, pelo Sr. Antonio Luiz Pinto, um exemplar deteriorado de *P. megistus* ♂, capturado nas mesmas condições que os anteriores.

O encontro de transmissor de tripanosomose americana infectado em domicílio de Santa Teresa foi o ponto de partida de pesquizas sistemáticas na região por técnicos da Divisão de Estudos de Endemias do Instituto Oswaldo Cruz, cujos interessantes resultados serão oportunamente divulgados.

* Recebido para publicação a 24 de fevereiro e dado à publicidade em abril de 1943.

Ainda por intermédio do Professor Costa Lima, recebemos em 30 de janeiro de 1943 um *P. megistus* ♀ capturado em domicílio á Travessa João Afonso, próximo ao Largo dos Leões e portanto em outra zona residencial do Distrito Federal. Infelizmente não foi possivel, neste caso, a pesquisa de flagelados intestinais em boas condições.

*Transmissão a animais do Schizotrypanum de P. megistus de Santa Teresa.*

Dejeções do exemplar recebido em 5-12-42 foram diluidas em soro fisiologico esteril e imediatamente inoculadas por via peritoneal em dois camondongos jovens (1.914 e 1.915). O sangue periférico de ambos foi examinado a fresco 23 vezes de 14-12-42 a 18-2-43, demoradamente, sempre com resultado negativo.

Relembrando experiências nossas anteriores, decidimos examinar o exsudato peritoneal dos camondongos, retirado por punção abdominal com pipeta capilar e colocado entre lâmina e lamínula. Raros tripanosomas, com movimentos semelhantes aos do *S. cruzi*, foram encontrados em ambos os animais nos dias 19 de dezembro e 19 de janeiro, tendo sido negativo o exame de 24-12-42 (material muito escasso).

Estes animais continuam em observação. Foram submetidos a provas de xenodiagnóstico com barbeiros "limpos", cujos resultados já verificados foram os seguintes :

Camondongo 1.914 — Em 19-12-42 (data em que o exsudato peritoneal mostrara tripanosomas a fresco) foi sugado por diversos barbeiros, que realisaram segunda sucção no mesmo animal em 13-1-43. Sobreviveu apenas uma ninfa de *P. megistus*, que dissecada em 19-1-43 estava bem infectada. Seu conteudo retal foi inoculado em três camondongos por via subcutânea (pele do dorso): de 27-1-43 a 17-2-43 tiveram 7 exames de sangue negativos, mas tripanosomas foram encontrados no exsudato peritoneal de dois deles, em 17-2-43 e 19-2-43. Um único individuo observado após coloração apresentava morfologia característica de *Schizotrypanum*, com núcleo quase mediano.

Outro xenodiagnóstico foi praticado no camondongo 1.914 em 6-1-43. Os três insetos utilizados foram dissecados em 17-2-43, estando negativas duas larvas de *T. infestans* e positiva uma larva de *Rhodnius prolixus* (escassos flagelados).

Camondongo 1.915 — uma ninfa de *P. megistus* o sugou nos dias 19-12-42 e 13-1-43; dissecada em 18-2-43, mostrou-se moderadamente infectada.

Material dos insetos positivos destas provas foi inoculado em cobaia, aguardando-se os resultados.

Pelo exposto, vê-se que o *Schizotrypanum* de que era portador o barbeiro de Santa Teresa é dotado de fraca virulência, não chegando a produzir infecção sanguínea aparente em camondongos brancos ainda jovens. Como vimos, tripanosomas só puderam ser verificados no sangue periférico pelo xenodiagnóstico, ao passo que no líquido peritoneal puderam ser observados ao exame a fresco, em dois casos com intervelo de um mês.

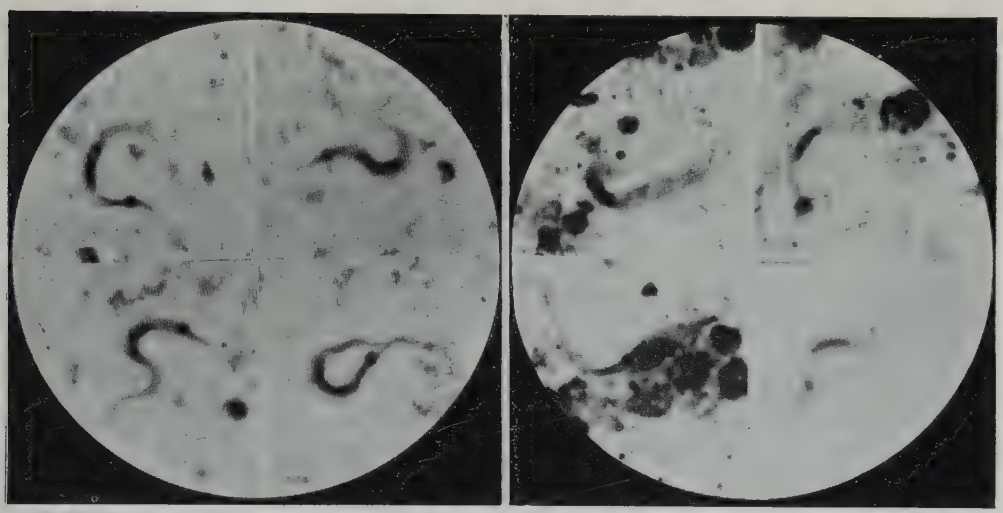


Fig. 1. Fig. 2.

Tripanosomas metaciclicos e critidias das dejeções de *Panstrongylus magistus* de Santa Tereza, Distrito Federal. Alcool absoluto, Giemsa. 1.700 vezes. Foto M. Cezar.

Anteriormente observaramos fato análogo inoculando camondongos com insetos infectados com amostra pouco virulenta de *Schizotrypanum,* nas seguintes circunstâncias : "Em três tentativas que fizemos para infectar camondongos com dejeções de *T. infestans* muito infectados que haviam sugado na Argentina uma gambá naturalmente infectada, não conseguimos verificar infecção sanguínea, mas em um dos animais constatamos a presença de raros tripanosomas no exsudato peritoneal puncionado poucos dias depois da inoculação. Estes triatomas nos foram enviados pelo Dr. C. Romaña que nos informara terem sido muito benignas as infecções que obtivera por inoculação de sangue da "comadreja" (gambá) em que se infectaram os barbeiros" (Dias, 1936, pág. 71).

## SUMÁRIO

É referido o encontro de barbeiros (*Panstrongylus megistus*) adultos em residências do Distrito Federal, nos bairros de Santa Teresa (Rua Almirante Alexandrino) e de Botafogo (Travessa João Afonso).

Um exemplar capturado em Santa Teresa estava infectado por flagelados, critidias e tripanosomas metacíclicos, fato pela primeira vez assinalado na Capital da República.

Dejeções do inseto infectado foram inoculadas em camondongos brancos, determinando apenas infecções sanguíneas inaparentes, reveladas pelo xenodiagnóstico. Entretanto, no exsudato peritoneal dos animais foram encontrados a fresco tripanosomas com caracteres de *Schizotrypanum*.

Os transmissores da doença de Chagas até agora referidos no Distrito Federal são : *Panstrongylus megistus, Panstrongylus geniculatus, Triatoma vitticeps, Triatoma oswaldoi* e *Triatoma rubrofasciata*.



*Agradecimento*

O autor tem a maior satisfação em deixar expressa sua gratidão ao Pro- às mãos e que constituiram objeto do presente trabalho. Agradecimentos são tambem devidos ao Dr. Luiz Moreira da Costa Lima, que reconheceu e capturou os primeiros barbeiros em Santa Teresa.


## REFERÊNCIA


Dias, Emmanuel

1936. Revisão geral dos Hemoflagelados de Quiropteros. IX Reunião da Sociedade Argentina de Patologia Regional, Buenos Aires, 1 : 10-88.

# Sobre uma variedade de Spiniger flavofasciatus Stal, 1859 (*)

por

C. A. C. Seabra e C. R. Hathaway

(Com 1 figura no texto)

Examinando uma pequena coleção de Hemipteros cedida ao Dr. Emanuel Dias pela Fundação Rockfeller, encontramos vários representantes do gênero Spiniger.

Para determiná-los, recorremos principalmente à revisão do referido gênero feito pelo Professor Costa Lima em 1940 (Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 35 (1): 1-123, 71 figs.).

Encontrámos, entre os mesmos, um de espécie muito próxima de *Spiniger* (*Spiniger flavofasciatus* Stal, 1859.

Comparado com um exemplar da coleção do Museu Nacional, apanhado pelo Sr. E. May em São João Água Preta (Ilhéos, Baía, 9-10-1928) e considerado pelo Professor Costa Lima como pertencente à citada espécie, pareceu-nos tratar-se de uma variedade dessa espécie, que designamos *espiritosantensis*.

*Spiniger* (*Spiniger*) *flavofasciatus espiritosantensis* n. var. Exemplar holotípo.

Eis as principais diferenças em relação com *Spiniger* (*Spiniger*) *flavofasciatus flavofasciatus* Stal, 1859:

*Fêmea*: Cor geral do corpo mais escura. Cabeça quase negra, exceto o rostrum, que apresenta o 1.º e 2.º segmentos amarelados.

Antenas negras. Lobo anterior e posterior do pronotum totalmente negro, exceto a parte visinha à borda anterior.

* Recebido para publicação a 25 de fevereiro e dado à publicidade em abril de 1943.

Espinho de scutellum um pouco mais longo.

A parte interna (estreitada) da faixa clara transversal do corium é de cor branca e não testácea como em *flavofasciatus* tipico.

Fêmures (exceto os quadris) e tíbias do par posterior negros; tíbias anteriores e médias com a metade distal negra.

Em *flavofasciatus flavofasciatus*, os fêmures e as tíbias de todas as pernas são como descreve Stal, "testaceo-flavescens".

Abdomen mais escuro que em *flavofasciatus flavofasciatus*.

Connexivum com áreas claras e escuras intercaladas bem visiveis (em *flavofasciatus flavofasciatus* quase não se distinguem as máculas negras).

*Holotípo*: 1 ♀ apanhada no Espírito Santo, em abril de 1940, pelo Sr. R. C. Shannon, com o n. 4.540 da coleção do Instituto Oswaldo Cruz.

# Infecção experimental de carrapatos (Amblyomma cajennense) em ratos com lepra Stefansky (*)

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

(Com duas figuras no texto)

A infecção natural do acariano *Laelaps echidninus* pelo bacilo de Stefansky foi verificada e estudada por D. H. Currie e H. T. Hollmann em 1910 e 1911, chegando eles à conclusão de que esse parasito poderia ser um dos meios de transmissão da lepra murina de rato a rato, facto que E. Marchoux e V. Chorine comprovaram experimentalmente, em 1939.

Conta o Prof. Marchoux que em 1913 retirou de ratos leprosos, cuja infecção datava de 7 a 10 meses, piolhos que triturou e injectou em quatro ratos sadios, dos quais três se infectaram, concluindo que :

*"Les poux peuvent donc absorber et conserver les baciles de Stefansky... "mais la transmission ne se produit par piqûre."*

Nos exemplares de *Laelaps* retirados de murídeos gravemente doentes Marchoux e Chorine encontraram três variedades de bacilos acido-resistentes :

"1.° — *un bacille court et trapu ayant tous les caractères de celui du pou;* 2.° — *un bacille long, non alcoolo-résistant et;* 3.° — *un bacile fin alcoolo-et acido-résistant ressemblant à celui du rat."*

Com triturado dos aludidos *Laelaps* esses autores inocularam cinco ratos jovens, dos quais dois morreram no correr de 10 dias e três ficaram leprosos entre 5 e 13 meses. Marchoux e Chorine puderam verificar que, pelo menos durante três dias, esse pequeno acariano conserva vivo, no seu organismo, o bacilo de Stefansky.

À vista desses factos resolvi tentar a infecção dum ixódida muito disseminado no Brasil, o *Amblyomma cajennense,* com o bacilo de Stefansky, pois que em notas anteriores deixei exuberantemente provado que ele se infecta. facilmente, no homem, com o bacilo de Hansen.

* Recebido para publicação a 1 de março e dado à publicidade em abril de 1943.

**Experiências com o *Amblyomma cajennense***

4-1-943. Dos sete ratos restantes do lote 31, inoculados a 10-7-941 com emulsão de leproma STEFANSKY, selecionei dois com tumores integros, de consideravel tamanho, nas regiões axilares direitas, e cuja infecção datava de 17 meses. Desbastados, à tesoura, os pelos do peito e abdomen desses ratos, amarrei um deles, pelas quatro patas como si fosse para autopsiá-lo, numa bandeja metálica e apliquei sobre ele, contendo-os à custo, seis carrapatos adultos (*A. cajennense*), duas femêas e quatro machos, capturados nas paredes do estábulo do *Instituto Vacinogênico de Manguinhos.*

Fui auxiliado nesta experiência pelo Dr. HERMINIO LINHARES e pelo servente IDALINO que, infelizmente, foi mordido pelo murideo na mão esquerda.

Dois carrapatos de cada sexo prenderam-se ao animal entre 1 e 10 minutos. Após três horas de sucção, que representa um repasto muito insuficiente, retirei da pele do rato as duas femeas e um dos machos, deixando o outro preso em local que o murideo não o alcançaria com a boca, depois de solto na gaiola. (Numa experiência anterior o rato comeu todos os carrapatos que coloquei sobre ele, dentro dum grande cristalizador).

Dos três carrapatos retirados dois tinham sugado nas imediações do tumor.

Janeiro 6 — Tentei alimentar noutro rato leproso os carrapatos que haviam sugado no dia 4, sem sucesso.

Janeiro 7 — Retirei do 1.º rato o carrapato ♂ que deixei nele no dia 4.

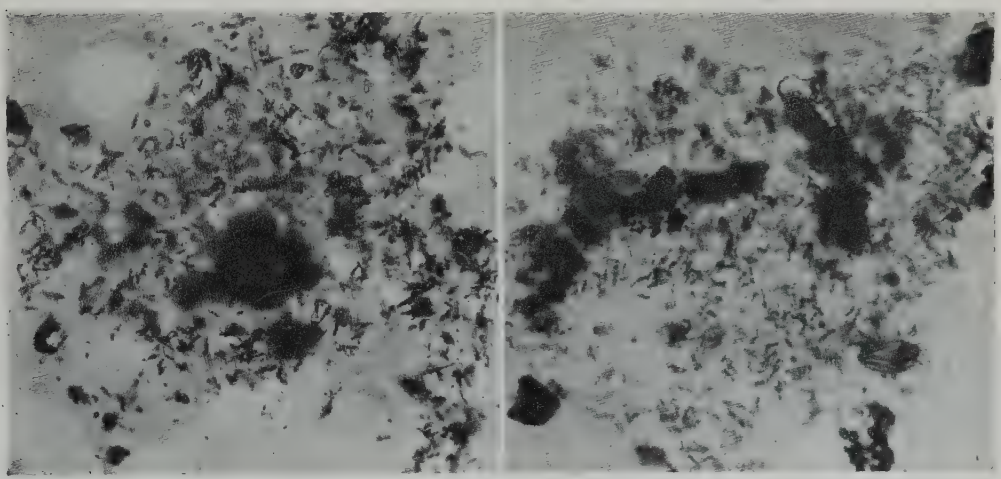
O seu repasto durou 72 horas. Dissecado sobre lamina o seu conteúdo intestinal mostrou-se sanguinolento. Esse esfregaço, corado pelo ZIEHL-NEELSEN revelou, numa só parte da lâmina, massas de bacilos a. a. r. como se vê na 2.ª figura abaixo. A morfologia e disposição desses bacilos não nos deixam dúvida sobre a sua identidade : *são os da lepra murina.*

Janeiro, 8 — As 2 ♀♀ de *Amblyomma* que haviam sugado durante três horas o 1.º rato, no dia 4, foram mergulhadas, durante 20 minutos, em soluto a 10 % de soda cáustica, depois lavadas duas vezes em água distilada esteril e trituradas em gral esmerilhado, triturador proprio para material destinado a culturas. A emulsão desse triturado foi semeada em 6 tubos de LOEWENSTEIN, que continuam na estufa a 37.º C. O esfregaço do resto desse material, corado pelo ZIEHL-NEELSEN, revelou, tambem numa só parte da lâmina, duas massas de bacilos a. a. r. idênticas às anteriores, descobertas pelo meu assistente Dr. LINHARES, e parcialmente representadas na 1.ª figura do cliché que ilustra esta nota preliminar.

Janeiro, 23 — Com o auxilio doutro servente, apliquei no 2.º rato selecionado 16 exemplares de *A. cajennense* trazidos do estábulo, de manhã.

Apenas quatro deles (25 %) prenderam-se ao animal, sugando-o de 5 a 6 horas, em pontos distantes do tumor : na virilha, escroto, pernas, etc.

Postos de lado os 12 carrapatos que não quizeram sugar, tive a lembrança de aplicar sobre o rato dois barbeiros que tinha trazido de Minas Gerais, e que estavam famintos, um *Triatoma infestans* ♀ e um *Panstrongylus megistus* ♂, que sugaram cerca de uma hora. O *P. megistus* defecou logo apos o seu repasto, uma boa dose de fézes negras como tinta da China, que examinei após coloração pelo ZIEHL e apesar de negativas para bacilos a. a. r.



*Microfotos de J. Pinto.*

Dois aspectos de esfregaços de fezes de *Amblyomma cajennense*, o da esquerda dum exemplar femea que sugou rato leproso durante 3 horas e o da direita de exemplar macho que o sugou 72 horas. Essas massas de bacilos de *Stefansky* se assemelham às de esfregaços de orgãos de murideo doente.

semeei-as em três tubos de LOEWENSTEIN, que se contaminaram dentro de três dias. Os assistentes do Curso de Saude Pública do I. O. C., doutores ESTACIO FIGUEIREDO E ROCHA LAGOA, assistiram parte desta importante experiência.

No dia 25 de janeiro eu e o Dr. HERMINIO LINHARES tentamos uma nova experiência com carrapatos, que tivemos de suspender porque fomos, ambos, mordidos pelo rato leproso. No dia 1 de fevereiro apliquei sobre um dos aludidos ratos 16 exemplares de *A. cajennense*, do estábulo. Apenas 4 (25 %) prenderam-se logo ao animal, todos em pontos distantes do tumor. Os ixódidas preferem sugar nos membros do animal. Transferido o murideo da bandeja onde estava amarrado para um tubo de tela de arame, foi deixado dentro dum grande recipiente de vidro para evitar a fuga dos carrapatos, caso abandonassem o seu hospedador. No dia 2, 26 horas após o início da experiência, retirei os carrapatos do rato e puz este em liberdade. O exame microscópico dos 4 carrapatos, feito de um a um de 2 a 5 de fevereiro, foi ne-

gativo. No dia 8 fiz mais uma experiência aplicando 8 novos carrapatos num dos ratos doentes, três deles o sugaram durante 3 horas e foram guardados até o dia 15-2 quando foram triturados e examinados, tendo sido tambem negativos para bacilos a. a. r.

Os ratos que foram utilisados para estas experiências estavam com bacilemia, como o verificou, a meu pedido, o Dr. LINHARES, mas é tão pequena a quantidade de sangue que um carrapato não fecundado poderá absorver num repasto de poucas horas — quando o seu repasto habitual dura até uma semana — que a maioria das pesquisas bacterioscópicas rotineiras foi negativa. Estou certo, entretanto, de que sendo conseguido que os carrapatos suguem sobre o tumor ou suas imediações, o que eles sempre evitam, a positividade desses exames aumentará.

Os resultados obtidos bastaram para convencer-me de que será sempre facil infectar carrapatos em ratos leprosos e viavel a transmissão da infecção a outros murideos por deposição, na sua mucosa ocular, ou por inoculação, como fez MARCHOUX, da emulsão de triturado dos ixódidas infectados. Esta experiência final depende de longo tempo, de biotério controlado pelo experimentador e de auxiliares competentes e de boa vontade.

Ao terminar esta nota desejo agradecer ao Dr. HERMINIO LINHARES a sua valiosa cooperação nestas experiências.

## SUMMARY

The A. succeeded, after various experiments, to infect ticks (*Amblyomma cajennense*) with STEFANSKY bacillus, upon feeding them in rats suffering from murine leprosy, in advanced stages. The A. thinks that will be ease to transfer the sickness from rat to rat by means of inoculation of triturate of infected ticks, as did MARCHOUX with *Laelaps echidninus*.

Manguinhos, 27 de fevereiro de 1943.

### *BIBLIOGRAFIA*

1. CURRIE, D. H. AND HOLLMANN, H. T.
1910. A contribution to the study of rat leprosy.
United States Public Health Bulletin n. 41. Nov. 1910.

2. CURRIE, D. H. AND HOLLMANN, H. T.
1911. Further observations in rat leprosy.
U. S. Public Hearth Bulletin, n. 50. Oct. 1911.

3. MARCHOUX, E. ET CHORINE, V.
1939. Transmission de la lèpre du rat par les poux et par les Laelaps.
Bull. Soc. Pathol. exot., T. 32, n. 45 : 477.

# Transmissão de imunidade antiamarílica da mãe aos filhos, em camondongos (*)

por

Herminio Linhares

A possibilidade de transmissão da imunidade passiva ou ativa da mãe ao filho, tem certo interesse em biologia experimental e no terreno da epidemiologia.

Assim, em regiões indenes ou onde não grassa há muito tempo epidemia, ou mesmo casos esporádicos de febre amarela, os resultados obtidos em prova de proteção com soro de crianças nativas destas localidades, suscitaram a hipótese de ter havido uma imunização passiva por transferência de anticorpos, através do leite ou da placenta, da mãe imune, após infecção natural ou por vacinação, a seus filhos.

Este processo de imunização viria ainda explicar a razão de serem relativamente benignas as infecções amarílicas, em crianças de localidades onde a febre amarela é endêmica.

A existência de imunidade por transmissão de anticorpos através da placenta e, provavelmente, pelo leite, foi observada por Hoskins (1) na febre amarela experimental de macacos, e por Stefanopoulo (2), em camondongos. Este, em colaboração com Laurent e Wassermann (3) verificou que o sangue do cordão umbilical de mulheres imunes, assim como o leite, davam prova de proteção positiva, em contraste com os controles obtidos de mulheres normais cujos resultados eram negativos.

Soper, Beeuwkes, Davis e Kerr (4), provaram haver transmissão de imunidade passiva pouco duradoura, da mãe ao filho, no homem e macaco, por passagem de anticorpos através da placenta, pelo menos para a grande maioria de casos. Por fim, Stefanopoulo e Nagano (5), mostraram que a transmissão por via placentar de anticorpos amarílicos da mãe ao filho, é real, não somente para o homem e macaco, mas ainda para roedores (camondongo, cobaia e coelho) sendo que nestes últimos a imunidade dura de 20 a 30 dias; anticorpos podem ser transmitidos por aleitamento aos camon-

* Recebido para publicação a 1 de março e dado à publicidade em abril de 1943.

dongos recem-nascidos, após inoculação de dose relativamente elevada de soro antiamarílico equíneo.

O camondongo é o animal ideal para se estudar a transferência de imunidade da mãe ao filho, pela facilidade com que é criado no laboratório, o número relativamente grande de filhos que costuma ter, o pequeno período de gestação, o crescimento rápido dos recem-nascidos e o manejo facil devido à tolerância com que as fêmeas suportam as substituições necessárias às investigações.

A finalidade deste trabalho é verificar a possibilidade de transmissão de imunidade de camondongos fêmeas a seus filhos, estudar as vias pelas quais são feitas estas transferências e examinar vários aspectos do problema no que concerne ao tempo necessário para imunização, a duração, à influência da idade.

MÉTODOS E MATERIAL

1. Amostra de virus: Foi usado virus neurotrópico Francês de passagem em cérebro de camondongos.

2. Animais de experiência: Camondongos brancos, suiços, criados no laboratório. Fêmeas acasaladas geralmente com 40 a 60 dias de idade, na proporção de 1 macho por 4 fêmeas; quando estavam em adiantado período de gestação, foram isolados em outras caixas. Os filhos foram desmamados ao atingirem a idade de 21 dias. Conservamos 5 a 6 filhos para cada fêmea, afim de que pudessem se desenvolver bem.

3. Métodos de imunização das fêmeas :

   *a*) Imunização ativa : As fêmeas de camondongo foram inoculadas com 0,12 cm3, por via subcutânea, de suspensão a 15 % em solução fisiológica, de virus neurotrópico Francês de cérebro de camondongos moribundos com encefalite amarílica. Esta suspensão é preparada no momento de usar.

   *b*) Imunização passiva : Usamos soro de Rhesus hiperimune, cujo título variou, após diversas dosagens, entre 1.000 e 2.000 (M. 2). Conforme a experiência, fêmeas receberam maior ou menor quantidade de soro.

Fêmeas, tanto para imunização ativa como passiva, foram inoculadas, de acordo com a experiência, antes ou depois de parirem.

4. Provas de imunidade :

   *a*) Nas fêmeas : para verificação de imunidade, as fêmeas foram inoculadas com 0,03 cm 3 intracerebral, de suspensão a 2 % de goma de amido, em solução fisiológica, e com 0,20 cm 3 intraperitoneal, de suspensão a 15 % de virus neurotrópico.

   *b*) Nos filhos em experiência: filhos com mais de 21 dias foram inoculados de modo indêntico às fêmeas; os filhos de 21 dias receberam 0,03 cm.3 intraperitoneal, de virus a 15 %; os filhos, de recem-nascidos a 17 dias, foram inoculados com 0,01 ou 0,02 cm 3, por via subcutânea, da mesma suspensão de virus.

5. Observação dos animais: Os camondongos foram examinados diariamente durante todo o transcurso das experiências.

6. Controle do virus: As suspensões de virus usados foram sempre controladas por inoculação em grupos de camondongos normais.

7. Todas as experiências para pesquisas de virus em camondongos recem-nascidos, fetos e placentas, foram feitas triturando o material em um gral e fazendo suspensão a 10 % em solução fisiológica. O material foi inoculado por via intracelebral (0,03 cm 3) em grupos de 6 camondongos adultos.

8. Sempre que fêmeas foram inoculadas, separavamos outras normais, em igual número, para controle e para as substituições necessárias.

PARTE EXPERIMENTAL

1. *Demonstração de imunidade em filhos nascidos de fêmeas imunes.*

Nesta experiência preliminar, para verificar a possibilidade de se tornarem imunes, filhos oriundos de fêmea imunizada, foram inoculadas 8 fêmeas grávidas, que pariram entre 1 e 4 dias depois. Obtivemos um total de 40 filhos que foram inoculados quando completaram 21 dias; as fêmeas tambem receberam virus para verificação de imunidade. Todos os camondongos ficaram vivos, demonstrando terem adquirido imunidade.

Podemos concluir desta experiência, que filhos de fêmea inoculada próximo da época de parir, adquirem imundade, decorridos 21 dias.

Falta averiguar agora se a imunização é ativa ou passiva, por passagem de virus ou anticorpos, através da placenta ou do leite.

2. *Testes para demonstrar se o virus pode atravessar a placenta ou ser veiculado pelo leite.*

A possibilidade de uma infecção dos camondongos durante a vida intrauterina, por passagem de virus através da placenta, ou posteriormente pelo leite, não podia ser de todo afastada. Três experiências diversas foram feitas afim de elucidarmos esta questão.

Na primeira, fizemos inoculação intracerebral (0,03 cm.3) em camondongos adultos, normais ,de suspensão a 10 % em solução fisiológica, de 12 recem-nascidos, filhos de diferentes fêmeas inoculadas 1 a 3 dias antes de parirem. Os resultados foram todos negativos, não sendo possivel a evidenciação do virus.

Na segunda experiência inoculamos 2 fêmeas em adiantado período de gravidez e sacrificamo-las 12 a 24 horas depois. Retiramos cuidadosamente os fetos, levamos em solução fisiológica, trituramos em gral, e fizemos suspensão a 10 % em água fisiológica; as placentas foram retiradas e tratadas de modo idêntico; estas suspensões foram inoculadas em grupos de 6 camondongos adultos, por via intracerebral (0,03 cm.3). Sangue foi colhido das fêmeas, no momento de sacrificá-las, para pesquisa de virus circulante. Apenas o sangue e as placentas da fêmea inoculada 12 horas antes, evidenciaram pequena quantidade de virus (2/6 e 3/6); os 11 fetos inoculados em grupos de camondongos, não demonstraram a presença de virus em seu organismo.

Na terceira experiência duas fêmeas recem-paridas receberam virus por via subcutânea. Os filhos, em um total de 10, foram sacrificados 24 horas depois e inoculados em camondongos; não foi evidenciado virus.

E' lógico supor, depois destas experiências, que o virus neurotrópico não atravessa a placenta, nem infecta camondongos recem-nascidos, pelo leite.

3. *A imunidade transferida é passiva.*

Uma vez concluido que o virus não atravessa a placenta, nem é veiculado pelo leite, só nos resta admitir que a imunidade é passiva, por transferência de anticorpos da fêmea imune a seus filhos.

Ademais, a maioria de fêmeas inoculadas ativamente em nossas experiências, pariram 15 a 30 dias depois de receberem virus. Este geralmente circula em camondongos apenas durante algumas horas e, para que houvesse uma transferência de virus, seria necessário que estivesse no sangue. Tal fato, não podendo se verificar nestas fêmeas inoculadas, devemos concluir que o processo de transferência da imunidade é por veiculação de anticorpos

através do leite ou placenta. Acreditamos que a fêmea seja capaz de transferir substâncias protetoras durante um longo período, mas este poder decrescerá gradativamente, quanto mais afastada for a época em que sofreu a infecção, e, alem disso, dependerá, naturalmente, do grau de infecção sofrida.

4. *Demonstração da transferência de imunidade para placenta.*

Não há senão duas vias capazes de transferir uma imunidade passiva da mãe ao filho; a primeira, antes de parir, é a via placentar, e a segunda após o nascimento, é a transmissão pelo leite. Estudaremos primeiro a via placentar.

Inoculamos 4 fêmeas, que pariram cerca de 20 dias após receberem virus, e foram imediatamente substituidas por outras normais, que tambem acabavam de parir. Os filhos foram inoculados no mesmo dia em que nasceram.

Obtivemos os seguintes resultados :

Dos 23 filhos de fêmeas imunizadas, 21 sobreviveram à inoculação do virus, ao passo que, dos 22 filhos de fêmeas normais, apenas 2 não morreram.

Podemos concluir que anticorpos atravessam a placenta e são capazes de neutralizar o virus inoculado, pelo menos, logo após o nascimento.

5. *Demonstração da transferência de imunidade pelo leite.*

Inoculamos 4 fêmeas de camondongo no dia em que pariram e deixamos que alimentassem os filhos durante 21 dias. Nesta data, inoculamos os 22 filhos obtidos, os quais demonstraram terem adquirido anticorpos protetores capazes de neutralizar o virus inoculado. As substâncias protetoras elaboradas na fêmea, após o nascimento dos filhos, foram transferidas pelo leite e absorvidas no tubo digestivo, protegendo os jovens animais. Não só o leite deve ser muito rico em anticorpos, como tambem, grande é a permeabilidade dos intestinos nos camondongos jovens, facilitando a penetração das substâncias protetoras ingeridas com o leite.

6. *Verificação da imunidade em camondongos de 21 dias.*

Depois de termos demonstrado que, tanto o leite com a placenta, podem deixar passar anticorpos, resta averiguar qual a via mais frequente e a que garante maior tempo de imunidade. Queremos verificar se os anticorpos, transmitidos por qualquer das vias, são igualmente encontrados quando os camondongos atingem a idade de 21 dias.

Acasalamos 2 lotes de fêmeas, um dos quais recebeu virus. Pariram em média 25 dias mais tarde; trocamos imediatamente depois do nascimento dos filhos, fêmeas normais por imunes, de maneira que camondongos nascidos de mães imunes foram amamentados por fêmeas normais e filhos normais receberam leite de fêmeas imunes. Esta troca deve ser feita logo após o nascimento, afim de que recem-nascidos de fêmeas imunes não se alimentem na própria mãe.

Quando terminou o período de aleitamento (21 dias) todos os camondongos receberam virus.

Obtivemos os seguintes resultados :

*a*) Em 112 filhos de fêmeas normais, aleitados por fêmea imune, 108 demonstraram terem adquirido imunidade, ou seja 96,4 %.

*b*) Em 109 filhos de fêmeas imunizadas, aleitados por fêmeas normais, só 11 resistiram à inoculação de virus, isto é, 10 %.

Assim mesmo, parece-nos elevada a percentagem para filhos de fêmeas imunes, o que talvez possa ser explicada por terem alguns camondongos se alimentado antes da troca, o que não é impossivel, ou devido a uma maior resistência individual de alguns deles. De qualquer modo, é evidente que a capacidade de transferir anticorpos, pela placenta, não é suficiente para proteger os animais, senão por alguns dias após o nascimento. Esta experiência demonstra que a transmissão de imunidade é feita por passagem de anticorpos pelo leite e apenas ligeira imunidade é adquirida através da circulação placentária.

7. *Duração da imunidade adquirida por passagem de anticorpos através da placenta.*

Uma vez averiguado que os anticorpos transferidos pela placenta desaparecem rapidamente, só protegendo os camondongos por alguns dias, resta ainda verificar o tempo médio necessário para não mais serem evidenciados.

Camondongos recem-nascidos, oriundos de fêmeas imunizadas cerca de 20 dias antes, foram aleitados por fêmeas normais, e inoculados em dias diferentes, entre recem-nascidos e com 17 dias, para verificação do decréscimo de imunidade (Ver quadros ns. I e II).

Os resultados obtidos demonstram que a imunidade passiva, transferida pela placenta, é de curta duração, diminuindo rapidamente após os primeiros dias do nascimento, para desaparecer quase totalmente a partir do 11.º dia.

QUADRO N. I

DEMONSTRAÇÃO DO DECRÉSCIMO DA IMUNIDADE PLACENTAR EM FILHOS DE MÃES IMUNES AMAMENTADOS POR FÊMEAS NORMAIS

| N. DE CAMONDONGOS | IDADE NO DIA DA INOCULAÇÃO | RESULTADOS | | |
|---|---|---|---|---|
| | | mortos | vivos | % de vivos |
| 33 | recem-nascidos | 2 | 31 | 94 |
| 17 | 1 dia | 3 | 14 | 82 |
| 23 | 2 dias | 3 | 20 | 87 |
| 17 | 3 » | 1 | 16 | 94 |
| 17 | 4 » | 5 | 12 | 70 |
| 12 | 5 » | 4 | 8 | 67 |
| 10 | 6 » | 4 | 6 | 60 |
| 12 | 7 » | 5 | 7 | 58 |
| 12 | 8 » | 7 | 5 | 41 |
| 6 | 9 » | 5 | 1 | 17 |
| 9 | 11 » | 9 | 0 | 0 |
| 9 | 13 » | 9 | 0 | 0 |
| 6 | 15 » | 6 | 0 | 0 |
| 12 | 17 » | 12 | 0 | 0 |

8. *Tempo médio necessário para camondongos adquirirem imunidade pelo leite.*

A permeabilidade da mucosa gastroduodenal, em camondongos jovens, é muito grande, de sorte que, em pouco tempo de aleitamento, a quantidade de anticorpos absorvida é suficiente para neutralizar o virus inoculado.

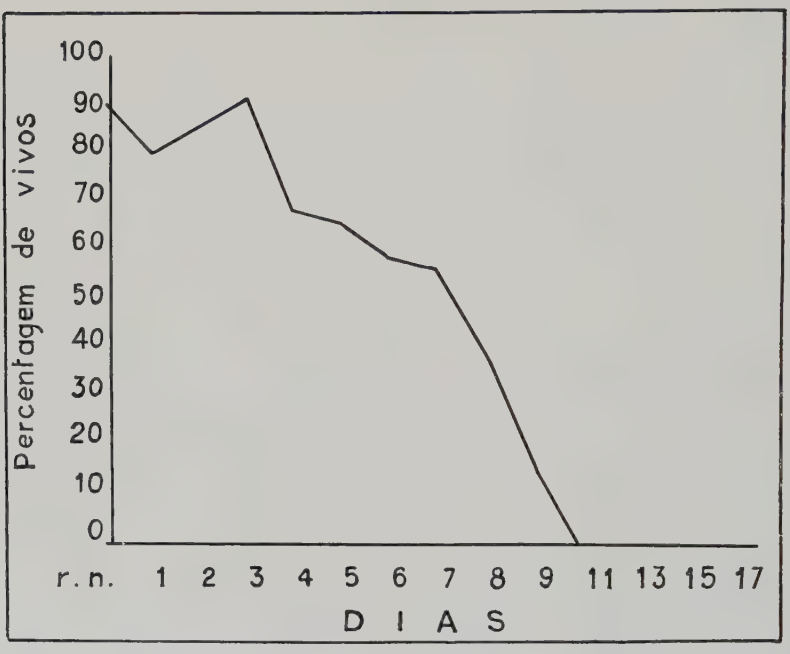
O virus pode ser evidenciado no cérebro de camondongos jovens, inoculados por via subcutânea ou intrapetoneal, 24 horas depois e talvez antes. Uma vez na célula nervosa, os anticorpos não teem mais ação sobre o virus; isto equivale a dizer que camondongos infectados recebem anticorpos capazes de neutralizar o virus, apenas até o dia em que foram inoculados. Se, por exemplo, um camondongo inoculado no 5.º dia, morre de encefalite no 10.º dia, a quantidade de anticorpos absorvida e que poderia evitar a infecção, é a porção veiculada pelo leite até o 5.º dia, porque no 6.º dia o virus já penetrou na célula nervosa, não mais sofrendo a ação dos anticorpos.

Nossa intenção, nesta experiência, é estudar o acréscimo de imunidade adquirida, de acordo com o número de dias de aleitamento.

Camondongos normais recem-nascidos foram aleitados por fêmeas imunes e inoculados em dias diferentes, entre o dia do nascimento e o 17.º dia.

QUADRO N.º II

Representação gráfica do decréscimo de imunidade transferida através da placenta, em relação à idade dos filhos de mães imunes, aleitados por fêmeas normais




Verificamos que, mesmo nos primeiros dias após o nascimento, é possivel, em pequena escala, a absorção de anticorpos em quantidade suficiente para haver neutralização do virus inoculado. Quanto maior o período de aleitamento em fêmea imune, tanto menor o índice de mortalidade, e, a partir do 10.º dia, a grande maioria dos animais sobrevive â inoculação de virus (Ver quadros ns. III e IV).

9. *Capacidade de camondongos jovens adquirirem anticorpos de acordo com a idade e o tempo de aleitamento em fêmeas imunes.*

Queremos observar nesta experiência, se filhos normais, aleitados a partir do 10.º e 15.º dias, em fêmea imune, apresentam posterior imunidade e, se camondongos amamentados em fêmeas imunes, durante os 10 e 15 primeiros dias e depois em fêmeas normais, estão imunes no fim do período de aleitamento.

**QUADRO N. III**

DEMONSTRAÇÃO DO AUMENTO DE IMUNIDADE TRANSFERIDA PELO LEITE EM RELAÇÃO COM O TEMPO DE ALEITAMENTO DE FILHOS NORMAIS EM FÊMEAS IMUNES

| N. DE CAMONDONGOS | IDADE NO DIA DA INOCULAÇÃO | RESULTADOS | | |
|---|---|---|---|---|
| | | vivos | mortos | % de mortos |
| 33 | recem-nascidos | 3 | 30 | 90 |
| 21 | 1 dia | 3 | 18 | 86 |
| 23 | 2 dias | 8 | 15 | 65 |
| 17 | 3 » | 4 | 13 | 70 |
| 17 | 4 » | 5 | 12 | 70 |
| 12 | 5 » | 5 | 7 | 58 |
| 11 | 6 » | 6 | 5 | 45 |
| 9 | 7 » | 5 | 4 | 44 |
| 10 | 8 » | 8 | 2 | 20 |
| 11 | 9 » | 10 | 1 | 9 |
| 11 | 11 » | 11 | 0 | 0 |
| 9 | 13 » | 9 | 0 | 0 |
| 6 | 15 » | 6 | 0 | 0 |
| 12 | 17 » | 12 | 0 | 0 |

Substituimos duas fêmeas normais por duas imunes, quando os filhos estavam respectivamente com 10 e 15 dias de idade, de maneira que obtivemos :

fêmea imune + 4 filhos normais, de 10 dias;
fêmea normal + 5 filhos de fêmea imune, com 10 dias;

fêmea imune + 6 filhos normais, de 15 dias;
fêmea normal + 6 filhos de fêmea imune, com 15 dias.

Todos os camondongos foram afastados das fêmeas, quando atingiram a idade de 21 dias e inoculados imediatamente.

Os seguintes resultados foram obtidos :

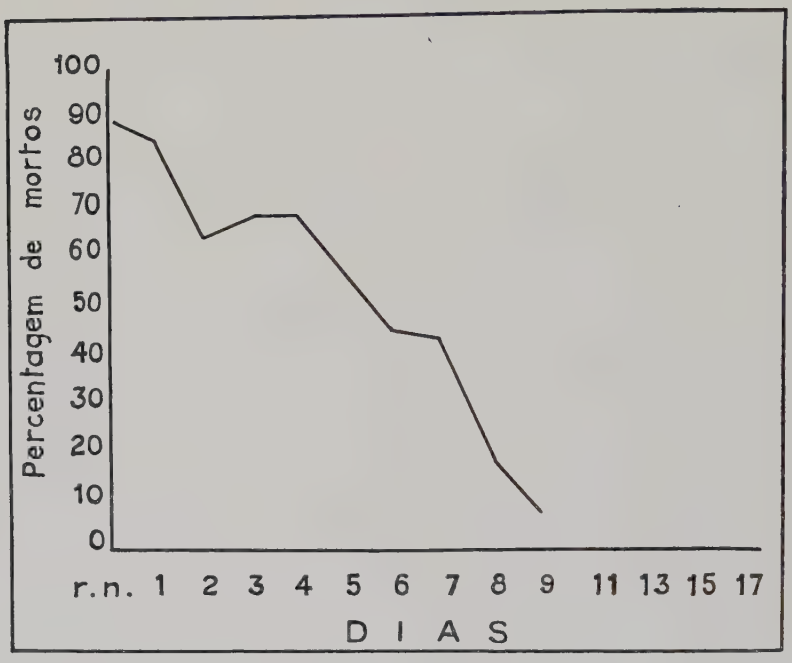
Os 4 filhos normais, amamentados por fêmea imune a partir do 10º dia, demonstraram ter adquirido imunidade e, por outro lado, dos 5 filhos de fêmea imune, aleitados depois do 10º dia em fêmea normal, apenas 1 morreu de encefalite.

Dos filhos de fêmea normal, aleitados a partir do 15º dia em fêmea imune, 3 morreram de encefalite e os outros 3 não evidenciaram sintomas de infecção; mas, todos os filhos de fêmea imune, aleitados por fêmea normal, somente depois do 15.º dia, sobreviveram à inoculação do virus.

108.882 — F. 7

QUADRO N.º IV

Representação gráfica do decréscimo de mortalidade em relação com o tempo de aleitamento de camondongos normais em fêmeas imunes




Verificamos, por estas experiências, que a mucosa gastro-intestinal dos camondongos, apresenta facil permeabilidade à passagem de anticorpos, durante todo o período de aleitamento e que o leite continua transferindo substâncias protetoras, em quantidade suficiente para conferir imunidade durante todo o transcurso da amamentação, dependendo, naturalmente, o grau de imunidade adquirida, do número de dias que os camondongos recebem anticorpos. Ademais, os 10 primeiros dias de aleitamento em fêmea imune foram suficientes para garantir imunidade aos animais, pelo menos, até a idade de 21 dias.

10. *Duração da imunidade adquirida pelo aleitamento em fêmea imune.*

A imunização ativa produz imunidade por muito tempo, quase sempre por toda a vida; o mesmo, porem, não acontece quando se faz imunização passiva, que é sempre temporária.

Queremos verificar por quanto tempo é possivel encontrarem-se camondongos imunes, depois de terem sido aleitados por fêmea imune durante 21 dias. Nosso número de observações é pequeno, mas pode dar uma idéia geral.

Inoculamos 5 grupos de 6 camondongos, com 35, 40, 50, 65 e 80 dias de idade, com virus neurotrópico, por via intraperitoneal.

Obtivemos 3 camondongos imunes, nos 6 inoculados com 35 e 1 nos inoculados com 40 dias; todos os demais morreram de encefalite.

Parece que camondongos aleitados em fêmeas imunes, apresentam imunidade passiva, pouco duradoura.

Esta imunidade está naturalmente na dependência dos anticorpos transmitidos e absorvidos; assim, os filhos de uma fêmea de camondongo que recebera virus duas vezes durante o período de gravidez e ainda uma vez durante a época do aleitamento, demonstraram estar imunes com 35 dias de idade (6/6).

11. *Transferência de imunidade a camondongos, por fêmeas imunizadas passivamente.*

Para determinar a possibilidade de transferência de anticorpos, através da placenta e do leite, em fêmeas imunizadas passivamente contra o virus de febre amarela, fizemos as seguintes experiências :

Uma fêmea grávida foi inoculada diariamente com 0,5 cm.3 subcutâneo, de soro de Rhesus hiperimune, durante 8 dias consecutivos, isto é, até a véspera de parir. Foi substituida logo após ter parido, por outra fêmea normal. Inoculamos os filhos da fêmea imunizada e aleitados por fêmea normal, no dia em que nasceram; todos, em número de 5, ficaram vivos, demonstrando terem adquirido anticorpos por via placentar. Por outro lado, a fêmea imunizada que aleitou camondongos normais, foi novamente inoculada desta vez com 1 cm.3 de soro por via intraperitoneal, no 5°, 10°, 18°, 19° e 20° dias de amamentação. Estas novas inoculações foram feitas porque a imunidade passiva decresce rapidamente e, se não reinoculássemos a fêmea, provavelmente em pouco tempo não haveria mais transmissão de anticorpos. Os camondongos foram inoculados quando atingiram a idade de 21 dias e, em 6, apenas 1 morreu; podemos concluir que fêmea imunizada passivamente transfere anticorpos pelo leite.

*b*) Inoculamos uma fêmea grávida com 1 cm.3 de soro de Rhesus hiperimune, durante os 3 dias que antecederam à data em que pariu. Imediatamente, depois, foi substituida por fêmea normal e os recem-nascidos inoculados; dos 5 camondongos que receberam virus, apenas 1 morreu. Os recem-nascidos normais, tranferidos para a fêmea imunizada, foram tambem inoculados; todos, num total de 5, morreram de encefalite.

Verificamos, não só que soro hiperimune inoculado por 3 dias consecutivos antes do parto, é suficiente para proteger camondongos, como tambem que camondongos normais, amamentados por fêmea imune, mas inoculados recem-nascidos, não adquirem anticorpos suficientes para neutralizar o virus.

*c*) Uma fêmea normal recem-parida, recebeu, durante 5 dias consecutivos ao parto, 1 cc. intraperitoneal de soro de Rhesus hiperimune. Os filhos foram inoculados no 6.° dia e todos sobreviveram. Fica assim demonstrado que bastam apenas poucos dias de aleitamento para garantir uma imunidade transitória nos camondongos jovens.

*d*) Imunizamos uma fêmea grávida, inoculando 1 cm.3 de soro hiperimune durante os 5 dias que precederam o parto, mas depois de parir não mais prosseguimos na inoculação de soro; quando os filhos atingiram a idade de 21 dias, foram inoculados com virus e morreram todos com sintomas de encefalite.

Sumariando, podemos concluir destas experiências, que camondongos imunizados passivamente, com dose elevada de soro de Rhesus hiperimune, transferem uma imunidade temporária a seus filhos, tanto pela placenta como pelo leite.

DISCUSSÃO

O conceito geralmente admitido que mamíferos hemocoriais, tais como homem, macaco, roedores, transmitem imunidade através da placenta, quase que exclusivamente, tem sido várias vezes contestado, principalmente para roedores.

Ehrlich (6) já havia verificado que fêmeas de camondongo podem transmitir, por aleitamento, consideravel grau de imunidade a seus filhos, quando inoculados com determinadas substâncias de origem vegetal, como abrina, ricina e robina; mesmo, se fêmeas imunes amamentam camondongos normais, estes adquirem grande imunidade. Verificou, com Huebener (7) que para a toxina tetânica, esta imunidade é pouco duradoura. Trabalhos recentes de Culbertson (8,9), com ratos e camondongos, demonstraram que a trans-

missão de anticorpos, quando estes roedores são imunizados, respectivamente com *Trypanosoma lewisé* e *T. duttoni,* se faz principalmente por meio do leite.

Verificamos, tambem, que, em camondongos, anticorpos podem ser transmitidos pela placenta, mas que a via mais frequente e que assegura maior imunidade é pelo leite.

A passagem de virus através da placenta ou pelo leite, não parece possivel, pois nós não conseguimos isolar virus nem mesmo em fetos de fêmeas recem-inoculadas com doses elevadas de virus neurotrópico.

A imunidade passiva adquirida por camondongos jovens é sempre de curta duração. Por via placentar, camondongos com 10 dias de idade dificilmente demonstrarão imunidade, ao passo que, pelo aleitamento, este período é mais extenso, mas provavelmente sempre menos de 2 meses. Por outro lado, a duração da imunidade dependerá não só da capacidade individual do camondongo para receber anticorpos através de mucosa gastroduodenal, como de vários fatores ligados à fêmea, tais como a intensidade de infecção sofrida e sua própria capacidade produtora de anticorpos, o número de filhos amamentados, e, talvez, o tempo de duração dos anticorpos no sangue, pois, a presença de substâncias protetoras no leite deve estar na dependência direta destes no sangue.

O leite, segundo nossas observações, apresenta anticorpos por um longo período, mas é preciso que os camondongos se alimentem vários dias seguidos para que adquiram uma imunidade suficientemente grande que seja capaz de neutralizar o virus inoculado.

Durante todo o período de aleitamento o aparelho gastrointestinal é suficientemente permeavel para passarem anticorpos.

Não só a imunização ativa das fêmeas, como tambem a imunização passiva, pode transferir imunidade. Naturalmente, esta última deve ser menor, dependendo porem da dose inoculada e do número de dias de aleitamento.

Em qualquer dos casos, parece-nos que a via principal para transferência de anticorpos de fêmea imune a camondongos é através do leite.

## SUMÁRIO E CONCLUSÕES

1. Fêmeas imunizadas ativa e passivamente, podem transmitir anticorpos protetores a seus filhos.
2. Os camondongos adquirem imunidade pela placenta e principalmente após o nascimento, por ingestão de leite de fêmea imune.
3. O virus não pode ser transmitido por qualquer das duas vias.

4. A imunidade transferida pela placenta desaparece muito mais rapidamente que a imunidade transmitida pelo leite.
5. Filhos de fêmea normal, rapidamente adquirem imunidade se forem amamentados em fêmea imune.
6. Camondongos com mais de 10 dias absorvem tão bem anticorpos como nos primeiros dias do nascimento, e o leite veicula durante todo o período de amamentação substâncias protetoras.

## *SUMMARY AND CONCLUSIONS*

1. Females rendered immune actively and passively against yellow fever virus may transmit protective antibodies to their young ones.
2. Mice acquire immunity through the placenta and principally after birth by ingestion of milk of an immune female.
3. The virus can not be transmitted by either of the two ways.
4. The immunity tranferred through the placenta disappears much more rapidly than immunity transmited by milk
5. Young ones from a normal female acquire immunity rapidly if fed by an immune female.
6. Mice of more than 10 days absorb antibodies just as well as during the first days of their birth, and the milk carries with it protective substances during the whole suckling period.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hoskins, M.; Jour. Immunol., 126, 391, 1934.
2. Stefanopoulo, G. J.: Ann. Inst. Pasteur: 52, 553, 1934.
3. Stefanopoulo G. J., Laurent, D. e Wessermann, R.: C. R. Socc. Biol.: 122, 915, 1936.
4. Soper, F. L., Beeuwkes, H., Davis, N. C. e Kerr, J. A.: Amer, Jour. of Hyg.: 27, 351, 1938.
5. Stefanopoulo G. J. e Nagano, Y.: C. R. Soc. Biol.: 128, 334, 1938.
6. Ehrlich, P.: Zeitschr. f. Hyg.: 12, 183, 1892.
7. Ehrlich, P. e Huebener, W.: Zeitschr. f. Hyg.: 18, 51, 1894.
8. Culbertson, J. T.: Jour. Parasitology, 24, 65, 1938.
9. Culbertson, J. T.: Jour. Immunol., 28, 51, 1940.

# Inoculação de virus amarílico em gatos jovens (*)

por

Herminio Linhares

Atualmente, a sensibilidade de animais de qualquer espécie ao virus amarílico, está sendo investigada afim de determinar-se a relação possivel com a manutenção das epidemias de febre amarela silvestre.

Embora as pesquisas com os representantes da família dos FELÍDEOS sejam, em geral, muito dificeis, é possivel estudar um de seus exemplares, isto é, o gato doméstico. Muitas pesquisas, é verdade, já foram feitas sem, entretanto, estarem de acordo.

Usando uma amostra viscerotrópica (Asibi) para infectar gatos, Monteiro (1) conseguiu, não só infectá-los, como fazer passagem de virus em outro gato. Em suas experiências, sugere ainda mais, que o sangue de gatos inoculados, colhido depois de 30 dias, fica com o poder de provocar em Rhesus posterior imunidade. Alem disso, enquanto as tentativas de Findlay (2) e de Nicolau e Baffet (3) para infetar gatos por via intracerebral com virus neurotrópicos, foram infrutíferas, Fonseca e Artigas (4) publicaram que gatos jovens são sensiveis ao virus amarílico e morrem com sintomas de encefalite, sendo possivel fazer passagem de virus, de gato a gato jovem. Findlay somente conseguiu obter anticorpos protetores nos soros.

Neste trabalho, é nossa intenção contribuir para a resolução deste problema, relatando os resultados obtidos por inoculação intraperitoneal e intracerebral, das amostras, viscerotrópica (Asibi) e neurotrópica (Francês), em gatos jovens.

## MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais : foram usados 27 gatos, de 1 a 4 meses de idade.
2. Amostras de virus :
   a) A amostra viscerotrópica (Asibi), usada nestas experiências, foi obtida de soros de Rhesus infectados e sangrados no 3.º ou 4.º dia. O material foi dessecado e rehidratado no momento de utilizar.

* Recebido para publicação a 1 de março e dado à publicidade em abril de 1943.

*b*) O virus neurotrópico usado foi a amostra "Francês", com grande número de passagens em cérebro de camondongos.

3. Inoculação :

Para inoculação intracerebral, fez-se, nos animais previamente anestesiados pelo eter, um pequeno corte na pele, próximo à linha mediana, e em seguida fez-se um pequeno orifício no osso, com um perfurador; introduziu-se a a agulha alguns milímetros e injetou-se a suspensão de virus; ao terminar, colocou-se colódio.

Para inoculação intraperitoneal não foi necessário anestesiar os animais.

Com virus neurotrópico os gatos foram inoculados com 0,25 e 0,50 cm.3 por via intracerebral, e 1,0 e 1,5 cm.3 por via intraperitoneal, da suspensão a 10 % do material, cujo título foi de 2.000.000 D. M. M. Dois gatos foram inoculados com 0,50 cm.3 de suspensão a 10 % de virus centrifugado e filtrado em Seitz, cujo título foi muito baixo (± 100.000 D. M. M.).

Com virus Asibi os gatos receberam 0,25 e 0,50 cm.3 por via intracerebral e 0,50 cm.3 por via intraperitoneal do material rehidratado, cujo título foi de 100.000 D. M. M.

4. Observação dos animais :

A temperatura retal foi tomada diariamente, pela manhã, e os gatos examinados todos os dias e registados os sintomas.

Foram sangrados no coração antes e 30 dias depois da inoculação, para prova de proteção em camondongos jovens.

Para pesquisa de virus circulantes, 16 gatos foram sangrados diariamente no coração, do 2º ao 12º dia post-inoculação e o sangue injetado, logo a seguir, no cérebro de camondongos jovens. A pesquisa de virus no sangue foi, alem disso, feita sempre que qualquer animal apresentou elevação térmica.

Os animais que morreram foram autopsiados, e, nos suspeitos, foi feito exame anatomopatológico do cérebro; para pesquisa de virus no cérebro ou no fígado, fizemos suspensão a 10 % do material, em solução fisiológica e inoculamos 0,03 cm.3 intracerebral, em grupos de 6 camondongos.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Experiências com virus neurotrópico.

Inoculamos 10 gatos por via intracerebral e 6 por via intraperitoneal. Foram infrutíferas as tentativas de isolar virus em todos os animais inoculados por via intracerebral e sangrados sistematicamente nos 12 primeiros dias post-inoculação. A pesquisa de virus no sangue durante a elevação de temperatura, deu sempre resultado negativo.

Dois gatos inoculados por via intracerebral morreram, um no 8°, outro no 18° dia. Ambos sempre se alimentaram mal, tomando apenas um pouco de leite; a temperatura oscilou, na grande maioria dos dias, entre 35° e 36° C. A sangria diária ainda contribuiu para enfraquecê-los mais, sendo que um deles (5954) morreu em consequência da sangria. Não conseguimos isolar virus nem do sangue nem do cérebro.

Dois gatos, inoculados por via intraperitoneal, morreram, um, com pneumonia no 11° dia e outro, devido à sangria, no 16° dia; neste, tentamos isolar virus no sangue, fígado e cérebro, com resultados negativos, porem, o soro posto em prova de proteção, deu positivo.

Dos 16 gatos observados, nenhum apresentou sintomas que pudessem ser imputados como infecção cerebral por virus amarílico (Ver quadro n. I).

Provas de proteção pré-inoculação negativas; provas de proteção post-inoculação com apenas dois resultados negativos.

**QUADRO N. I**

RESULTADOS DA INOCULAÇÃO DE GATOS COM VIRUS NEUROTRÓPICO

| VIA DE INOC. | D. M. M. INOCULADA | N. DO ANIMAL | PESO EM GRS. | OBSERVAÇÕES POST-INOCULAÇÃO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Dias com febre | Sintomas | Resultados | Prova de proteção |
| i. c..... | 1.600.000 | 5944 | 1540 | 6°, 7°, 8° | — | sobreviveu | positiva |
| i. c..... | 1.600.000 | 5946 | 1260 | — | — | sobreviveu | negativa |
| i. c..... | 800.000 | 5950 | 310 | — | — | sobreviveu | positiva |
| i. c..... | 800.000 | 5951 | 280 | — | anorexia hipotermia | morreu no 18° dia | — |
| i. c..... | 800.000 | 5952 | 320 | — | — | sobreviveu | positiva |
| i. c..... | 800.000 | 5953 | 300 | — | — | sobreviveu | positva |
| i. c..... | 800.000 | 5954 | 320 | — | anorexia hipotermia | morreu na sangria 8° d. | — |
| i. c..... | 800.000 | 5955 | 340 | — | — | sobreviveu | positiva |
| i. c..... | 160.000 | 5947 | 570 | 3°, 4° | — | sobreviveu | positiva |
| i. c..... | 160.000 | 5948 | 810 | 1°, 2°, 3° | — | sobreviveu | positiva |
| i. p..... | 5.000.000 | 12 | 1300 | 14°, 15° | — | morreu na sang. 16° d. | positiva |
| i. p..... | 5.000.000 | 13 | 1500 | — | — | sobreviveu | positiva |
| i. p..... | 3.200.000 | 3 | 700 | — | anorexia | morreu de pneumon. 11° d. | — |
| i. p..... | 3.200.000 | 4 | 900 | 8° | — | sobreviveu | negativa |
| i. p..... | 3.200.000 | 5 | 1400 | — | — | sobreviveu | positiva |
| i. p..... | 3.200.000 | 6 | 800 | — | — | sobrevive | positiva |

2. Experiências com virus Asibi.

Inoculamos 8 gatos por via intracerebral e 3 por via intraperitoneal.

Não obtivemos virus circulante nos animais sangrados do 2.º ao 12.º dia, nem mesmo durante o acesso febril (sangramos 3 gatos inoculados por via intracerebral e 3 por via intraperitoneal).

Morreram 3 gatos inoculados por via intracerebral.

*a*) Gato 10: foi encontrado morto no 11º dia. A autópsia revelou grande derrame no pericárdio, provavelmente devido à sangria. Foi feito exame anatomopatológico do cérebro, que nada demonstrou.

*b*) Gato 11 : morreu no 12º dia ; parece, pelo resultado da autopsia, que este animal morreu de pneumonia. Não conseguimos isolar virus do cérebro. O exame anatomopatológico do cérebro foi negativo.

*c*) Gato 5967: este caso é mais interessante; três dias após a inoculação, o gato começou a se alimentar mal e a temperatura, a partir do 4º dia, foi inferior a 36º. No 7.º dia apresentou sintomas de encefalite. Foi sacrificado neste dia; exames bacteriológicos feitos com sangue, cérebro e fígado, foram negativos; não foi possivel isolar virus do cérebro. Fizemos várias preparações do cérebro para exame anatomopatológico, que nos revelou: presença no cortex cerebral de pequenos focos de necrose, de neuronólise, hiperemia capilar e certa infiltração linfocitária, ora difusa, ora perivascular. Trata-se de um processo de encefalite pouco acentuado, sem semelhança ao que comumente produzem os virus neurotrópicos. Provavelmente encefalite tóxica.

Todos os outros animais nada demonstraram digno de nota. As provas de proteção pré-inoculação foram negativas; as provas de proteção post-inoculação deram resultados negativos para todos os animais que receberam virus por via intraperitoneal e 2 casos positivos para os gatos inoculados por via intracerebral (Ver quadro n. II).

DISCUSSÃO

No transcurso de nossas experiências morreram 7 gatos, mas, quer pela inexistência de sintomas, quer pelos resultados anatomopatológicos e das autópsias, foram afastadas as possibilidades das mortes serem resultantes de um processo infeccioso por virus amarílico.

## QUADRO N. II

RESULTADOS DA INOCULAÇÃO DE GATOS COM VIRUS ASIBI.

| VIA DE INOC. | D. M. M. INOCULADA | N.º DO ANIMAL | PESO EM GRS. | OBSERVAÇÕES POST-INOCULAÇÃO | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Dias com febre | Sintomas | Resultados | Prova de proteção |
| i. c..... | 1.600.000 | 7 | 640 | — | — | sobreviveu | positiva |
| i. c..... | 1.600.000 | 8 | 1000 | — | — | sobreviveu | positiva |
| i. c..... | 1.600.000 | 9 | 2000 | — | — | sobreviveu | negativa |
| i. c..... | 1.600.000 | 10 | 1500 | 6º e 7º | anorexia de 7º ao 11º d. | morto sang. 11º dia | — |
| i. c..... | 1.600.000 | 11 | 1400 | 11º | anorexia do 9º ao 12º d. | morto pneum. 12º dia | — |
| i. c..... | 800.000 | 5967 | 335 | — | anorexia; encefalite | sacrificado 7º dia | — |
| i. c..... | 800.000 | 5968 | 860 | — | — | sobreviveu | negativa |
| i. c..... | 800.000 | 5969 | 940 | 7º | — | sobreviveu | negativa |
| i. p..... | 1.600.000 | 5965 | 490 | — | — | sobreviveu | negativa |
| i. p..... | 1.600.000 | 5966 | 460 | — | — | sobreviveu | negativa |
| i. p..... | 1.600.000 | 5970 | 786 | — | — | sobreviveu | negativa |

Nossos resultados foram semelhantes aos de Findlay; Fonseca e Artigas, que concluiram serem gatos jovens sensiveis ao virus amarílico neurotrópico por via intracerebral, não fizeram provas que demonstrassem a especificidade do virus.

E' quase nula a sensibilidade de gatos, mesmo jovens, sendo apenas possivel obtermos anticorpos protetores no soro quando doses elevadas de virus neurotrópico e Asibi são inoculadas.

Não nos foi possivel obter virus circulante pesquisado do 2.º ao 12.º dia, post-inoculação de virus Asibi e neurotrópico, num total de 16 gatos; a presença de virus no sangue dos gatos, 30 dias após a inoculação e com o qual conseguiu Monteiro imunizar Rhesus, leva-nos à suposição de estarem já os Rhesus imunizados quando foram iniculados, o que não é raro, quando existem outros animais em experiência na mesma sala.

A prova de desvio de complemento, utilizada por Monteiro, é falha, podendo ser causa de frequentes erros.

Não nos foi possivel isolar do cérebro virus de nenhum animal morto durante o período de observação. As tentativas de isolamento de virus do sangue, quando apresentaram elevação térmica, foram infrutíferas.

Tudo nos leva a supor que estes animais não desempenhem qualquer papel como reservatórios naturais de virus, capazes de influenciar no problema epidemiológico da febre amarela.

SUMÁRIO

1. Gatos jovens inoculados por via intracerebral com doses relativamente grandes de virus neurotrópico ou viscerotrópico, e por via intraperitoneal com virus viscerotrópico, não demonstram virus circulante até o 12.º dia.
2. Tais gatos tambem não demonstraram sintomas ligados à infecção amarílica.
3. Foi impossivel isolar virus do cérebro dos gatos que morreram no decurso das observações e os exames anatomopatológicos não demostraram ter havido processo de encefalite (apenas um caso de encefalite tóxica).
4. O desenvolvimento de imunidade serológica, após a inoculação de virus neurotrópico por via intracerebral e intraperitoneal, foi observado na grande maioria dos casos; com virus Asibi, obtivemos apenas dois resultados positivos quando o virus foi inoculado por via intracerebral.

CONCLUSÃO

Gatos jovens são relativamente insensiveis ao virus amarílico, sendo possivel apenas evidenciar reação de imunidade.

*SUMMARY AND CONCLUSIONS*

1. Young cats inoculated intracerebrally with relatively large doses of neurotropic or viscerotropic virus, and intraperitoneally with viscecerotropic virus fail to show circulating virus up to 12 days post-inoculation.
2. Such cats also fail to show symptoms referable to the virus.
3. It was impossible to isolate virus from the brains of inoculated cats dying in the course of the experiments, and histological examinations of the brains failed to show escephalitis (only one case with toxic encephalitis).

4. The development of serological immunity after 30 days was observed in all but two of the cats inoculated intracerebrally or intraperitoneally with neurotropic virus; with Asibi strain, only two positive results were obtained, with the intracerebral route.

5. Young cats are relatively unsusceptible to yellow fever virus, only giving the reaction of immunity.

BIBLIOGRAFIA

1. Monteiro, J. L. : Brasil Médico : 44, 1087, 1930.
2. Findlay, G. M. : J. Path. and Bact. : 38, 1, 1934.
3. Nicolau, S. e Baffet, O. : Bull. Soc. Path. Exot. : 30, 611, 1937.
4. Fonseca F. da e Artigas, P.: Mem. Inst. Butantan : 12, 225, 1939.

# Suscetibilidade de camondongos ao virus amarílico administrado por vias extraneurais (*)

por

Herminio Linhares

As vias de inoculação pelas quais as infeções são produzidas em animais, para diversos virus patogênicos, tem importância particular, ajudando a caracterizar diferentes amostras de virus, assim como servindo para indicar possiveis moods de transmissão. Por outro lado, a suscetibilidade de diferentes espécies de animais, para uma dada amostra de virus, pode ser comparada, de acordo com as respostas à inoculação por várias vias; e, ademais, nas experiências feitas com uma única espécie de animal, é possivel comparar diferentes virus, de acordo com a capacidade de infecção ou de imunização, quando inoculado por vias diversas. Em tais experiências, pode-se demonstrar a afinidade especial de um tecido para um dado virus, e tambem sua capacidade de invadir o animal pela circulação em geral ou de outra maneira.

Contudo, uma vez escolhida uma dada espécie de animal, certos fatores, dentre os quais a idade é provavelmente o mais importante, podem afetar a resistência oferecida por qualque via.

O virus da febre amarela é representado por um grande número de amostras, quer naturais, quer modificadas por processos de laboratório, as quais possuem diferentes graus de virulência e afinidades tissulares.

Em camondongo, há muito é conhecido que o virus da febre amarela é apenas capaz de produzir infecção no sistema nervoso. A diferenciação de várias amostras, por infecção intracerebral em camondongos, só pode ser feita de maneira geral, de acordo com o período de incubação da doença e o tempo médio de sobrevida depois da inoculação de quantidades equivalentes em D. M. M. As infecções produzidas por inoculações extraneurais dependem da capacidade do virus alcançar o sistema nervoso, do local de inoculação. Em camondongos adultos, exceto por via intranasal, via nervo olfativo, as barreiras do sistema nervoso central são suficientes, e o virus em circulação, devido à inoculação extraneural, raramente pode se localizar no tecido nervoso, a menos que tais defesas sejam rompidas, por uma pre-

* Recebido para publicação a 1 de março e dado à publicidade em abril de 1943.

liminar inoculação de goma intracerebral. Essas barreiras, contudo, desenvolvem-se com a idade; assim, se se usa camondongos nos quais estas defesas naturais estão incompletamente desenvolvidas, ou nos quais as barreiras tiverem sido rompidas, pode-se fazer o estudo sobre a capacidade de amostras atingirem o sistema nervoso. O camondongo pode tornar-se, neste caso, um animal util para a medida de capacidade geral de invasão de uma amostra de virus, alem de demonstrar simplesmente suas qualidades neurotrópicas.

Nesta comunicação são relatados os estudos sobre as possibilidades de invasão, de diferentes amostras de virus, em camondongos de várias idades, nos quais o virus foi administrado por diversas vias, e os resultados observados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. *Amostras de virus* :

   *a*) Virus neutrotrópico Francês; obtido do cérebro de camondongos moribundos com encefalite, da passagem 555.

   *b*) Virus de vacina : virus 17D; material dessecado de um lote de vacina (A. 660) preparado com soro humano e embriões de pintos infectados.

   *c*) Virus Asibi : obtido de soros de Rhesus infectados e sangrados no 3.º e 4.º dia. Os soros foram dessecados e rehidratados no momento de usar.

   *d*) Virus Asibi Egg I : cuja origem (1) foi a 19.ª subcultura em meio do tipo de Maitland contendo tecidos de embrião de camondongos e depois mantido em série por inoculação direta em embrião de galinha; foi usado material da 81.ª passagem.

   *e*) Asibi Egg III : é semelhante à amostra anterior, mas o virus original é de soro de macaco; foi usado material da 8.ª passagem.

2. *Animais* : Camondongos suiços, criados no Laboratório. Foram usados camondongos muito jovens, de 0-6 dias, camondongos recem-desmamados, isto é, com 21 dias e adultos de 36 dias.

3. *Inoculações* : as diferentes técnicas de inoculação para cada tipo de experiência serão descritas no próprio texto de cada experiência. Aquí relatamos apenas a inoculação intracerebral de goma, feita em alguns grupos de camondongos com 21 dias e em todos os adultos. Prepara-se uma emulsão de goma de amido a 2 % e inocula-se 0,03 cm.3 intracerebral, usando seringa de tuberculina; esta inoculação é feita, comumente, 1 hora antes da administração de virus.

4. *Observações* :

*a*) Os animais foram observados, diariamente, durante 30 dias e todos os sintomas registados em cartões adequados.

*b*) Prova de imunidade : Findo o prazo de observação, todos os camondongos foram inoculados com 0,03 cm3 de goma de amido a 2 %, por via intracerebral e 0,20 cm3 intraperitoneal, de suspensão a 15 % (em solução fisiológica) de virus neurotrópico Francês, de passagem em cérebro de camondongo. Quando não há imunidade, os camondongos morrem, em geral, do 5.º ao 10.º dia.

5. *Títulos* :

As quantidades de virus foram determinadas pela inoculação intracerebral em camondongos suiços, adultos, anestesiados pelo eter, de 0,03 cm3 para cada camondongo, de diversas suspensões.

Foram preparadas diluições decimais de virus e com cada qual inoculado um grupo de 6 camondongos. A mortalidade de 50 %, o ponto limite na titulação, foi calculada pelo método de Reed e Muench (2). Uma D. M. M. é definida com a quantidade de virus contida em 0,03 cm3 da diluição "ponto-limite".

Virus neurotrópico deu título baixo, ± 1.000.000; usamos, nas experiências, suspensão a 10 %.

Virus de vacina foi usado em suspensão rehidratada, cujo título foi de ± 5.000.

O título do virus Asibi usado, foi 400.000; Asibi Egg I e III deram títulos de 10.000 e 5.000 respectivamente.

## PARTE EXPERIMENTAL

I. *Instilação de virus nas narinas.*

A mucosa nasal é uma das mais sensiveis para a penetração do virus, talvez mesmo podendo-se considerar como uma modalidade de inoculação neural, mas de interesse para comparação de várias amostras de virus amarílico. Findlay e Clarke (3) conseguiram infectar macacos e camondongos por instilação nasal de virus: em 50 camondongos, 36 tiveram encefalite e, dos 6 macacos usados, 5 ficaram doentes.

Nesta experiência trabalhamos apenas com camondongos jovens, de 21 dias, e dois métodos diversos foram usados para instilação do virus; no primeiro deixou-se cair lentamente a suspensão sobre as narinas e, pela inspira-

ção, o líquido penetrou com facilidade nas fossas nasais; no outro método, a agulha foi introduzida com facilidade alguns milímetros para dentro das narinas, injetando-se o líquido lentamente; com o animal anestesiado, é mínimo o perigo de feri-lo, sendo talvez esta a melhor técnica, pois sabemos exatamente a quantidade posta em contacto com a mucosa.

Experimentamos 3 amostras de virus e observamos os animais durante 30 dias; findo este prazo, todos foram inoculados, afim de estudarmos as possibilidades de desenvolvimento da imunidade.

A amostra de virus neurotrópico foi instilada na concentração de ± 100.000 D. M. M. por 0,03 cm3, em 23 camondongos, com e sem goma intracerebral, o que não mostrou diferenças nos resultados. 74 % dos camondongos morreram com encefalite e os restantes demonstraram ter adquirido immunidade (Quadro n. I).

**QUADRO N. I**

RESULTADOS DA INSTILAÇÃO DE VIRUS NAS NARINAS DE CAMONDONGOS COM 21 DIAS

| VIRUS | | GOMA I. C. | N. DE CAMONDONGOS | RESULTADOS | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Amostra | D. M. M. instiladas | | | N. de mortos c. encefalite | N. de imunes | Total infectado | % de infecção |
| Neurotr. | ± 100.000 | S | 11 | 8 | 3 | 11 | 100 |
| Neurotr. | ± 100.000 | N | 12 | 9 | 3 | 12 | 100 |
| Asibi | ± 400.000 | S | 11 | 2 | 9 | 11 | 100 |
| Asibi | ± 400.000 | N | 12 | 5 | 7 | 12 | 100 |
| Vacina | ± 10.000 | S | 12 | 0 | 7 | 7 | 58 |
| Vacina | ± 10.000 | N | 12 | 0 | 11 | 11 | 91 |

O virus Asibi, empregado na concentração de ± 400.000 D. M. M., para 0,03 cm3 foi instilado em 23 camondongos, dos quais 7 morreram com sintomas de encefalite e os sobreviventes provaram ter adquirido imunidade, quando reinoculados.

Por último, usamos a amostra de virus de vacina (17D), na concentração de ± 5.000 D. M. M., por 0,03 cm3 (instilamos 0,06 cm3) em 24 camondongos. Nenhum morreu de encefalite, mas, quando reinoculados, 18 mostraram-se imunes, ou melhor 75 %.

Devido à discordância entre as concentrações empregadas, há apenas possibilidades de comparar as amostras neurotrópica e Asibi. Ambas teem forte poder infectante por via nasal, talvez um pouco mais acentuado na

primeira. Examinando em conjunto, observamos que, em 46 camondongos, 24 morreram de encefalite, ou seja 52 %, resultados estes de acordo com os de Findlay e Clarke, que obtiveram, porem, percentagens mais elevadas (72%).

E' muito possivel que, se empregássemos virus de vacina em concentração idêntica à amostra Asibi, por exemplo, obtivéssemos diversos camondongos mortos por encefalite.

Temos a impressão que a inoculação intracerebral de goma de amido não tem influência neste caso. O fato de ter havido maior número de mortos com encefalite e, no caso de virus de vacina, maior número de imunes, nos animais que não receberam goma, não parece ter uma significação especial. Ora, é lógico assim supor, já que devemos considerar como a mais provavel via de infecção a penetração do virus pelos espaços linfáticos perineurais dos nervos olfativos, se bem que não possa ser de todo afastada a hipótese de penetração por via sanguínea.

II. *Instilação de virus no ouvido.*

A possibilidade de infectar camondongos jovens por passagem de virus através da mucosa intacta do ouvido, foi estudada por nós, com três amostras diferentes. A instilação foi feita deixando-se cair, gota a gota, o volume desejado, o mais internamente possivel, em comondongos anestesiados pelo eter. Todos os cuidados foram tomados afim de que não se produzisse qualquer solução de continuidade na mucosa, que pudesse alterar os resultados da experiência. Usamos apenas camondongos de 21 dias, de modo que, para cada material, um grupo fosse previamente inoculado com goma intracerebral (Quadro n. II).

**QUADRO N. II**

RESULTADOS DA INSTILAÇÃO DE VIRUS NO OUVIDO DE CAMONDONGOS COM 21 DIAS

| VIRUS | | GOMA I. C. | N. DE CAMONDONGOS | RESULTADOS | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Amostra | D. M. M. instiladas | | | N. de mortos c. encefalite | N. de imunes | Total infetado | % de infecção |
| Neurotr..... | ± 100.000 | S | 11 | 0 | 5 | 5 | 45 |
| Neurotr..... | ± 100.000 | N | 12 | 0 | 4 | 4 | 33 |
| Asibi..... | ± 400.000 | S | 11 | 0 | 3 | 3 | 27 |
| Asibi..... | ± 400.000 | N | 9 | 0 | 2 | 2 | 22 |
| Vacina..... | ± 10.000 | S | 12 | 0 | 1 | 1 | 8 |
| Vacina..... | ± 10.000 | N | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Instilamos em 23 camondongos cerca de 100.000 D. M. M. de virus neurotrópico. Não foi observado qualquer sintoma de infecção durante o período de observações, mas, quando inoculados para prova de imunidade, 9 mostraram-se imunes, ou seja 39 %.

Da amostra viscerotrópica Asibi, instilamos 0,03 cm3 de suspensão correspondente a ± 400.000 D. M .M., em 20 camondongos; assim como na amostra anterior, nenhum animal morreu durante os 30 dias de observação, mas 5 adquiriram imunidade, isto é, 25 %.

Por fim, em 23 camondongos, nos quais foi instilado 0,06 cm3 de virus de vacina, correspondendo a cerca de 10.000 D. M. M., apenas 1 mostrou-se imune, na prova de imunidade.

Estes resultados teem algum interesse, pois sugerem que o virus pode atravessar a mucosa do ouvido, se bem que com dificuldade e dar infecção inaparente, porem revelada na prova de imunidade. O número total de animais imunes, isto é, 15 em 66, cerca de 23 % (ou 32 % se nos referirmos somente ao virus Asibi e neurotrópico, pois o virus de vacina foi empregado em concentração muito menor) é relativamente elevado e afasta a hipótese destes casos serem devidos a escoriações no momento da instilação, ou mesmo uma rutura da membrana do timpano.

III. *Instilação de virus no olho.*

A possibilidade de infectar animais por penetração do virus amarílico através da córnea intacta ou escarificada, ou pela conjuntiva, ainda não levou, os diversos pesquisadores, a um acordo.

Assim Beeuwkes (4) acha que o virus não pode penetrar através da conjuntiva e, mais tarde, Theiler (5) não obteve infecção de camondongos depondo o virus na córnea, mesmo esfregando ou escarificando, mas conseguiu matá-los inoculando no olho; entretanto, os sobreviventes não demonstraram ter adquirido imunidade. Por outro lado, Marchoux (6) conseguiu infectar Rhesus por deposição de virus no saco conjuntival e idênticos resultados obtiveram Aragão e Costa Lima (7) usando fezes de mosquitos infectados; alem destes, Findlay e Clarke (3) instilaram virus neurotrópico no saco conjuntival de 20 camondongos e 8 tiveram encefalite. Nós pretendemos trazer uma pequena contribuição para este estudo, verificando a possibilidade de infectar camondongos com diversas amostras de virus amarílico, por simples instilação na córnea ou por escarificação feita com agulha de injeção.

Experimentamos três amostras de virus, geralmente, em camondongos de 21 dias; cada grupo foi dividido de modo que fosse possivel observar, para um mesmo material, animais com ou sem irritação da córnea que rece-

beram ou não goma intracerebral. Após um período de 30 dias de observação, os animais foram reinoculados, para verificação da imunidade (Quadro n. III).

**QUADRO N. III**

RESULTADOS DA INSTILAÇÃO DE VIRUS NA COREA

| IDADE | VIRUS | | TÉCNICA | | N. DE CAMONDONGOS | RESULTADOS | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Amostra | D. M. M. instiladas | Goma i. c. | Escarificação | | N. mortos c. encef. | N. de imunes | Total infectado | % infecção |
| Adultos..... | Neurotr. | ± 200.000 | N | N | 12 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| Adultos..... | Neurotr. | ± 200.000 | S | N | 5 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| Adultos..... | Neurotr. | ± 200.000 | S | S | 5 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| 21 dias..... | Neurotr. | ± 100.000 | S | S | 11 | 6 | 2 | 8 | 72% |
| 21 dias..... | Neurotr. | ± 100.000 | N | S | 14 | 1 | 4 | 5 | 35% |
| 21 dias..... | Neurotr. | ± 100.000 | S | N | 11 | 0 | 1 | 1 | 9% |
| 21 dias..... | Neurotr. | ± 100.000 | N | N | 15 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| 21 dias..... | Asibi | ± 400.000 | S | S | 12 | 0 | 3 | 3 | 25% |
| 21 dias..... | Asibi | ± 400.000 | N | S | 12 | 0 | 4 | 4 | 33% |
| 21 dias..... | Asibi | ± 400.000 | S | N | 12 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| 21 dias..... | Asibi | ± 400.000 | N | N | 12 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| 21 dias..... | Vacina. | ± 10.000 | S | S | 11 | 0 | 1 | 1 | 9% |
| 21 dias..... | Vacina. | ± 10.000 | N | S | 12 | 0 | 1 | 1 | 8% |
| 21 dias..... | Vacina. | ± 10.000 | S | N | 12 | 0 | 0 | 0 | 0% |
| 21 dias..... | Vacina. | ± 10.000 | N | N | 10 | 0 | 0 | 0 | 0% |

Em 22 camondongos adultos foram instiladas na córnea cerca de 200.000 D. M. M. e, em 51 camondongos jovens, ± 100.000 D. M. M. de virus neurotrópico Francês. Nenhum dos camondongos adultos (com ou sem escarificação; com ou sem goma intracerebral) mostrou sinais de infecção e todos morreram, quando reinoculados 30 dias depois, demonstrando não terem adquirido imunidade. Resultados muito diferentes foram porem obtidos em camondongos de 21 dias; a escarificação da córnea, nos animais que receberam goma, causou encefelite em 6 dentre 11, sendo que 2 dos 5 sobreviventes, mostraram ter adquirido imunidade, o que significa um total de 72 % de infecção; porem animais que não receberam goma, sofrendo apenas a escarificação, um só adoeceu, morrendo de encefalite, mas 4 tornaram-se imunes dentre os 19 sobreviventes, dando um índice geral de infecção de

35 %. Os animais não escarificados, com apenas uma exceção, não se infectaram.

A amostra Asibi, numa concentração de cerca de 400.000 D. M. M. por 0,03 cm3, foi usada em 48 camondongos de 21 dias. Nenhum camondongo morreu com sintomas de encefalite; contudo, nos animais que sofreram escarificação, 7 demonstraram ter adquirido imunidade, ou seja 29 %. Nos camondongos em que o virus foi instilado, sem que fosse a córnea escarificada, não houve infecção.

A terceira amostra usada foi de virus de vacina (17D), recebendo cada animal ± 100.000 D. M. M. Tambem neste caso não morreu qualquer camondongo e 2 (dentre os escarificados) adquiriram imunidade.

Os resultados obtidos em animais adultos, se bem que em pequeno número, sugerem ser muito dificil a infecção ou talvez mesmo impossivel.

Os resultados obtidos em camondongos de 21 dias se prestam para observação sobre as nítidas diferenças existentes entre os animais que sofreram ou não escarificação da córnea. Assim, se no primeiro caso em 72 camondongos, 30,5 % se infectaram (ou 41 % se consideramos apenas o virus Asibi e neurotrópico) em idêntico número de animais, em que apenas o virus foi instilado, somente um camondongo sobreviveu ao teste de imunidade.

Tais resultados demonstram ser muito dificil a infecção, mesmo de camondongos jovens, cuja suscetibilidade é muito maior que em adultos, quando o virus amarílico é apenas instilado sobre a córnea normal. A escarificação, entretanto, permite a penetração do virus, que pode alcançar o cérebro e matar os animais com encefalite ou produzir uma infecção inaparente capaz de imunizá-los. Devemos ainda relatar que a escarificação da córnea ocasiona frequentemente, intensa conjuntivite que, por certo, muito contribue para absorção do virus através da mucosa conjuntival hiperemiada.

A inoculação intracerebral de goma de amido mostrou resultados dúbios; assim, se com o virus neurotrópico há diferença flagrante entre os animais com e sem traumatismo cerebral, com o virus Asibi tal fato não se verificou.

IV. *Introdução de virus no estômago.*

Apesar da via gástrica apresentar muitos fatores que tornam dificil o controle, é de interesse verificar a possibilidade de infecção por esta via com diferentes amostras de virus, especialmente depois da comunicação de Findlay e Mac Callum (8), relatando ser possivel infectar Rhesus e *Cercopithecus oethiops* administrando, com sonda, virus no estômago; trabalharam com cinco amostras de virus e os animais que não morreram, adquiriram imunidade.

Para introdução do material, os camondongos foram anestesiados pelo eter e inoculados por meio de uma fina sonda reta de vidro, adaptada a uma seringa de tuberculina e introduzida com cuidado pelo esôfago. Em cada um, foi inoculado de 0,12 a 0,20 cm3. A possibilidade de traumatismo não pode ser completamente afastada, mas todos os cuidados foram tomados para evitá-lo.

Desta maneira foram examinadas cinco amostras de virus, em camondongos de 21 dias ou em adultos, ou ainda em ambos, sendo uma parte de cada grupo previamente inoculada com goma intracerebral.

Os camondongos foram observados durante 30 dias post-inoculação, tempo relativamente amplo para que se manifestassem sinais de encefalite. Findo este prazo, foram inoculados com virus neurotrópicos por via intraperitoneal e goma intracerebral (segundo a técnica usual descrita em material e métodos) para prova de imunidade.

A amostra de virus neurotrópicos de passagem, foi inoculada na concentração ± 100.000 D. M. M. por 0,03 cm3, em 12 camondongos adultos e 46 de 21 dias. Um, dentre os 6 camondongos adultos previamente inoculados com goma intracerebral, morreu aparentemente com encefalite amarílica. Os demais camondongos adultos não mostraram sinais visiveis de infecção, e, decorridos 30 dias, não resistiram à reinoculação( com apenas uma excecção), indicando que eles não tinham sido imunizados. Entretanto, resultados diferentes foram obtidos com camondongos de 21 dias; 29 deles morreram com encefalite, e 12 dos sobreviventes provaram ter adquirido imunidade quando reinoculados, dando um total de 31 infectados em 46 inoculados, ou seja 89 %. Não foi observada diferença entre camondongos com ou sem goma intracerebral.

A amostra Asibi, numa concentração de cerca de 400.000 D. M. M., por 0,03 cm3 foi usada para inocular 45 camondongos de 21 dias (0,12 cm3). Neste caso houve uma percentagem muito alta de infecção nos camondongos previamente inoculados com goma intracerebral; de 23 assim tratados, 5 morreram com encefalite e 17 mostraram, mais tarde, imunidade, dando uma incidência de infecção de 95 %. Entretanto, dos 22 camondongos sem goma, 5 tambem morreram de encefalite, mas somente 9 demonstraram posterior imunidade e a percentagem de infecção foi, assim, somente de 63 %.

Duas recentes amostras originárias da amostra Asibi, foram tambem experimentadas; são denominadas Asibi Egg I e Asibi Egg III. O número de camondongos empregados para esta prova, foi pequeno e os resultados em conjunto puderam ser melhor considerados. A experiência foi feita com a concentração de virus entre 5.000 a 10.000 D. M. M. por 0,03 cm3. De 11 camondongos adultos com goma intracerebral, um morreu com ence-

falite e 6 tornaram-se imunes, dando uma incidência total de infecção de 64%. Por outro lado, dos 12 camondongos de 21 dias empregados nesta experiência, apenas um morreu de encefalite, mas todos os outros demonstraram imunidade.

Em pequena experiência feita com 12 camondongos de 30 dias, que receberam goma intracerebral, usando Asibi Egg I, foi observado que 20 dias depois, mais de 50 % dos camondongos estavam imunes.

A última experiência foi feita com a amostra de virus de vacina (17D) correntemente usada, em concentração de mais ou menos 5.000 D. M. M. por 0,03 cm3. Aquí, foram novamente observadas diferenças entre camondongos com e sem goma intracerebral. Dos 24 camondongos previamente inoculados com goma, 4 morreram de encefalite e 15 tornaram-se imunes, dando um total de 19 infectados, ou 79 %; dos 23 camondongos que não receberam goma, 3 morreram de encefalite e 7 tornaram-se imunes, isto é, um total de 10 infectados, ou melhor 43 %.

O quadro n. IV sumaria esta experiência.

**QUADRO N. IV**

RESULTADOS DA INTRODUÇÃO DE VIRUS NO ESTÔMAGO

| IDADE | VIRUS | | GOMA I. C. I. C. | N. DE CAMONDONGOS | RESULTADOS | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Amostra | D. M. M. introduzidas | | | N. de mortos c. encef. | N. de imunes | Total infetado | % de infecção |
| Adultos | Neutror. | ± 650.000 | S | 6 | 1 | 1 | 2 | 33 |
| Adultos | Neurotr. | ± 650.000 | N | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 dias | Neurotr. | ± 650.000 | S | 22 | 14 | 6 | 20 | 91 |
| 21 dias | Neurotr. | ± 650.000 | N | 24 | 15 | 6 | 21 | 87 |
| 21 dias | Asibi | ± 1.200.000 | S | 23 | 5 | 17 | 22 | 95 |
| 21 dias | Asibi | ± 1.200.000 | N | 22 | 5 | 9 | 14 | 63 |
| Adultos | A. Egg I | ± 65.000 | S | 6 | 1 | 4 | 5 | 83 |
| 21 dias | A. Egg I | ± 65.000 | N | 6 | 0 | 6 | 6 | 100 |
| Adultos | A. Egg III | ± 35.000 | S | 5 | 0 | 2 | 2 | 40 |
| 21 dias | A. Egg III | ± 35.000 | N | 6 | 1 | 5 | 6 | 100 |
| 21 dias | Vacina | ± 35.000 | S | 24 | 4 | 15 | 19 | 79 |
| 21 dias | Vacina | ± 35.000 | N | 23 | 3 | 7 | 10 | 43 |

Considerando em conjunto, o grande número de camondongos infectados por via intragástrica (73%), com diversas amostras de virus, torna-se razoavel supor que o virus da febre amarela pode passar através da mucosa

intacta do tubo gastro-intestinal, desde que consideremos muito pequena a percentagem de camondongos que poderiam ter sofrido qualquer traumatismo da mucosa, ou já terem, anteriormente, qualquer lesão.

O fato de ser mais elevada a percentagem de camondongos jovens (21 dias) infectados, do que adultos, é provavelmente apenas uma indicação que camondongos jovens são mais acessiveis a uma infecção com pequena quantidade de virus na torrente circulatória, que nos camondongos mais velhos. A localização cerebral do virus é a causa provavel da infecção, e é indicada pelo fato de ser geralmente maior a incidência de infecção ocorrida em camondongos previamente inoculados com goma do que nos sem goma.

Esta experiência não se presta para uma comparação direta da capacidade de várias amostras de virus a uma infecção inicial por penetração através da mucosa gastro-intestinal, devido à nítida discordância existente entre as concentrações empregadas. Contudo, certos pontos interessantes podem ser observados, tais como a diferença entre o virus Asibi e neurotrópico, quando inoculados em camondongos de 21 dias que não receberam goma, o primeiro com 63 % de animais infectados e o último com 87 %, apesar do dobro de D. M. M. empregados para o virus Asibi; talvez isto seja uma indicação de que as barreiras intactas do sistema nervoso central sejam mais facilmente transpostas pela amostra neurotrópica. Com significação mais importante é a diferença nos resultados observados entre as amostra I e III de derivação recente da amostra Asibi, com a amostra 17D tambem originária de Asibi. Todas estas amostras não são patogênicas para o macaco, teem propriedades semelhantes em relação à inoculação intracerebral em camondongos, à multiplicação em embriões de galinha e cultura de tecido. Observou-se que 100 % de camondongos com 21 dias, que receberam virus Asibi Egg I e III, infectaram-se, enquanto camondongos semelhantes que receberam aproximadamente a mesma concentração de virus 17D, mostraram apenas 43 % de infecção, e, mesmo quando previamente inoculados com goma, apenas 79 %.

Uma questão não elucidada é se o virus penetra pela mucosa do estômago, do duodeno, ou, talvez, pelo esôfago. Entretanto, esta última hipótese é de todas a menos provavel; a sonda entra com facilidade até o estômago e não foram observadas regurgitações, pelo menos nos primeiros momentos que se seguiram à deposição de virus, sendo porem possivel que se dessem mais tarde. A contaminação do esôfago ou mesmo faringe, pela sonda, principalmente depois de retirada do estômago, não pode ser de todo afastada, mas a grande parte do material, senão todo, foi depositada no estômago. A quantidade líquida administrada, de 0,12 a 0,20 cm3 provavelmente

passa depressa para o intestino, não sofrendo a ação do pH gástrico; mesmo que a suspensão permaneça no estômago algum tempo, a influência da acidez não deve ser grande, por causa do volume líquido. Talvez, no caso da via gástrica, o volume líquido da suspensão tenha muita importância; por exemplo, se tivermos uma mesma concentração em D. M. M., mas em volumes líquidos diversos, o maior volume causará maior número de infecções; mas isto é uma simples hipótese. E', porem, muito provavel que o virus seja, não só absorvido pela mucosa gástrica, como tambem pelas paredes intestinais.

V. *Deposição do virus na pele.*

A possibilidade do virus amarílico atravessar a pele normal ou escarificada tem sido estudada por diversos pesquisadores, com resultados semelhantes nos casos de escarificação.
Para Beeuwkes (4), o virus pode atravessar a pele do Rhesus, escarificada, raspada e mesmo coberta de pelos, e, Aragão e Costa Lima (7) infectaram Rhesus por simples deposição, na pele normal, de fezes de mosquitos infectados. Marchoux (6), porem, não conseguiu que o virus atravessasse a pele íntegra de Rhesus, mais infectou-os fazendo escoriações cutâneas profundas. Bauer e Hudson (9), obtiveram infecção de Rhesus após esfregar supensão de virus na pele íntegra e escarificada. Theiler (5), usando a mesma técnica, imunizou 1 camondongo entre 6 utilizados. Os mesmos resultados foram obtidos por Peltier e col. (10), os quais concluiram que o virus amarílico neurotrópico possue a propriedade de atravessar a pele ligeiramente escarificada do homem e do macaco, provocando imunidade.

Nesta experiência vamos estudar a possibilidade de infectar camondongos muito novos, com idade variavel entre recem-nascidos e 6 dias, por simples deposição do virus, ou esfregando-o na pele íntegra e escarificada.

Foi empregada apenas a amostra neurotrópica na concentração de ± 100.000 D. M. M. por 0,03 cm3.

A simples deposição foi feita colocando a suspensão na região dorsal; em alguns camondongos passamos eter no local, afim de verificarmos se desengordurando a região, o virus poderia penetrar com mais facilidade. Nos outros camondongos, quer com a pele íntegra, quer depois de sofrer escarificações no dorso, feitas com agulha de injeção, a suspensão de virus foi esfregada várias vezes com o corpo de uma agulha grossa.

E' impossivel determinar exatamente a quantidade de virus empregada porque sempre se perdem pequenas porções de material, pela natural movimentação dos camondongos que, devido a tão tenra idade, não quisemos anestesiar; por outro lado, é possivel que depois da deposição do virus haja atrito

do camondongo com as paredes da caixa ou de uns com os outros, facilitando a entrada do virus.

A concentração de virus usada foi grande para camondongos novos, muito sensiveis ao virus amarílico, pelo menos se administrado por via intraperitoneal ou subcutânea.

Observamos ser possivel a infecção, por simples deposição de virus, em pequeno número de animais; assim em 72 camondongos usados, 7 morreram com encefalite, e um mostrou-se imune quando inoculado 30 dias depois, ou seja um índice de infecção de 11 %; o desengorduramento feito pelo eter não teve influência sobre o desenvolvimento da infecção. Nos animais em que esfregamos o virus na pele intacta, 13 morreram de encefalite, em 26 inoculados, dando 50 % de infecção. Nos animais que foram escarificados, obtivemos alto índice de mortalidade; em 30 camondongos em experiência, 23 morreram com encefalite e um mostrou-se imune quando reinoculado, obtendo-se assim 80 % de infecção.

**QUADRO N. V**

RESULTADOS DAS EXPERIENCIAS COM VIRUS NEUROTRÓPICO NA PELE

| IDADE | D. M. M. EMPREGADAS | TÉCNICA | N. DE CAMONDONGOS | RESULTADOS | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | N. de mortos c. encef. | N. de imunes | Total infectado | % de infecção |
| 0–1 dia | ± 100.000 | Deposição | 37 | 3 | 0 | 3 | 8 |
| 2 dias | ± 100.000 | Deposição | 10 | 1 | 0 | 1 | 10 |
| 3 dias | ± 100.000 | Deposição | 10 | 2 | 0 | 2 | 20 |
| 4 dias | ± 100.000 | Deposição | 10 | 1 | 1 | 2 | 20 |
| 6 dias | ± 400.000 | Deposição | 5 | 1 | 0 | 1 | 20 |
| r. nasc | ± 100.000 | Esfregaço | 8 | 3 | 0 | 3 | 37 |
| 3 dias | ± 100.000 | Esfregaço | 6 | 2 | 0 | 2 | 33 |
| 6 dias | ± 400.000 | Esfregaço | 12 | 8 | 0 | 8 | 66 |
| r. nasc | ± 100.000 | Escarif. | 10 | 8 | 0 | 8 | 80 |
| 3 dias | ± 100.000 | Escarif. | 10 | 7 | 0 | 7 | 70 |
| 6 dias | ± 400.000 | Escarif. | 10 | 8 | 1 | 9 | 90 |

Retiramos o cérebro de alguns camondongos mortos de encefalite, fizemos suspensão a 10 % em solução fisiológica e inoculamos 6 camondongos por via intracerebral, para cada uma suspensão. Os camondongos morreram com sintomas de encefalite, demonstrando a presença de virus no cérebro dos animais mortos.

A idade, nos primeiros dias, parece que não modifica a sensibilidade dos animais, desenvolvendo-se a infeção em percentagens mais ou menos semelhantes. Fato interessante foi que, enquanto 43 camondongos morreram com encefalite, apenas 2 demonstraram ter adquirido imunidade, quando inoculados 30 dias mais tarde; tal fato sugere que os camondongos muito jovens ou se infectam e morrem com encefalite, ou sobrevivem à deposição na pele por terem escapado à infeção devido ao virus não ter penetrado no organismo.

Como era de se esperar, a infecção através da pele íntegra dificilmente se deu, por ser o tegumento cutâneo uma barreira natural de defesa. Entretanto, a pele dos camondongos nos primeiros dias de nascidos é muito fina e sem quase nenhuma proteção pilosa, o que deve contribuir muito para facilitar a penetração do virus; assim, verificamos que, esfregando o virus sobre a pele íntegra, a absorção foi muito mais facil, sendo evidenciada pelo índice de infecção mais elevado, o que muito se acentuou quando o material foi esfregado na pele escarificada.

DISCUSSÃO

As experiências aquí descritas sugerem que as diversas amostras de virus da febre amarela administradas por vias extraneurais, podem infectar camondongos jovens, matando-os com sintomas de encefalite ou produzindo infecções inaparentes evidenciaveis, porem, nas provas de imunidade. A localização cerebral do virus é provavelmente a causa das infecções, o que pode ser melhor observado pela maior incidência verificada, em muitos casos, nos camondongos previamente inoculados com goma, mesmo nos animais jovens em que as barreiras hematoencefálicas estão ainda incompletamente formadas.

O virus, com exceção talvez no caso da via nasal, penetra no torrente circulatória de onde alcança em seguida o cérebro; a via nasal ainda não está de todo elucidada, mas parece que o virus pode seguir diretamente por via nervo olfativo, ou melhor, pelos espaços linfáticos perineurais, sem que seja necessário penetrar na circulação.

Tanto a pele como as mucosas normais são barreiras naturais à entrada do virus. Isto porem, não impede que certa quantidade de virus consiga transpô-las produzindo infecção, quando se administra grande número de D. M. M. As soluções de continuidade aumentam porem muito a percentagem de infecção como verificamos nos casos de escarificação cutânea e da córnea.

Dificil é fazer-se um estudo comparativo sobre a capacidade infectante das diversas amostras de virus devido às nítidas discordâncias entre as concentrações empregadas. Entretanto, se compararmos a amostra de virus neu-

rotrópico Francês com a de virus Asibi, verificamos que apesar da primeira ter sido empregada em dose inferior sempre produziu maior percentagem de infecção.

## *SUMÁRIO E CONCLUSÕES*

1. Virus neurotrópico Francês, Asibi e de vacina (17D) infectam camondongos jovens, quando instilados nas narinas, matando-os com encefalite ou desenvolvendo imunidade.
2. Virus neurotrópico Francês e Asibi (e talvez o virus de vacina) quando instilados no ouvido de camondongos jovens, podem infectá-los produzindo o desenvolvimento de imunidade.
3. Após instilação na córnea escarificada de camondongos jovens, virus neurotrópicos Francês, Asibi e, talvez de vacina, podem produzir infecção. Com a córnea íntegra, no entanto, não foi possivel infectar camondongos.
4. Virus neurotrópicos Francês, Asibi, de vacina, Asibi Egg I e Egg III introduzidos no estômago, podem infectar camondongos jovens, matando-os com encefalite ou imunizando-os.
5. E' possivel infectar camondongos de 0-6 dias de idade por simples deposição de virus ou esfregando a suspensão na pele íntegra e escarificada.

## *SUMMARY AND CONCLUSIONS*

1. French neurotropic, Asibi and vaccine (17D) virus, infect young mice (21 days) when instilled in the nostrils, killing them with symptoms of encephalitis or developing immunity.
2. French neurotropic virus and Asibi (and perhaps vaccine virus), when instilled in the ear of young mice, may infect them producing development of immunity.
3. After instilation in the scarified cornea of young mice, French neurotropic virus, Asibi and perhaps vaccine virus, may produce infection. The cornea being, however, whole it has not been able to infect mice.
4. French neurotropic virus, Asibi, vaccine, Asibi Egg I and Egg III introduced into the stomach, may infect young mice, causing e fatal encephalitis or rendering them immune.
5. It is possible to infect mice 0-6 days old by simple deposition of virus or rubbing the suspension on the whole and scarified skin.

BIBLIOGRAFIA

1. Penna, H. A. e Moussatché, H.: Brasil Médico, 38, 903, 1939.
2. Reed, L. J. e Muench, H.: Am. J. Hyg.: 27, 493, 1938.
3. Findlay, G. M. e Clarke, L. P.: J. Path. and Bact.: 40, 55, 1935.
4. Beeuwkes, H.: Recents Studies in Yellow Fever — Conferência da Febre Amarela. Dakar, 23 de abril - 1.º de maio de 1928.
5. Theiler, M.: Ann. Trop. Med. Parasitol.: 24, 249, 1930.
6. Marchoux, E.: C. R. Acad. Sc.: 187, 260, 1928.
7. Aragão, H. B. e Costa Lima, A.: Mem. Inst. Oswaldo Cruz: 9 (supl.) 133, 1929.
8. Findlay, G. M. e Mc Callum, F. O.: J. Path. and Bact.: 49, 53, 1939.
9. Bauer, J. H. e Hudson, N. P.: Am. J. Trop. Med.: 8, 371, 1928.
10. Peltier, M., Durieux, C., Jonchère, H. e Arquié, E.: Bull. Acad. Med. Paris: 121, 657, 1939.

# Suscetibilidade de pintos ao virus amarílico neurotrópico (*)

por

Herminio Linhares

A possibilidade de infecção de pintos por virus amarílico, tem sido motivo de estudos feitos por nós, desde 1939.

As pesquisas iniciais foram feitas com o intuito de adaptar o virus neurotrópico Francês em cérebro de pinto e estudar sua capacidade de infecção, ou possivel aumento de sua virulência, após determinado número de passagens, em um animal provavelmente suscetivel.

Devemos considerar como animal suscetivel, todo aquele em que houver possibilidade de multiplicação do virus, mesmo sem alteração aparente do estado geral do animal. Se pintos inoculados com pequenas doses de virus, demonstrarem ter havido acréscimo deste, podemos considerá-los como susctiveis. Esta averiguação pode ser feita por pesquisa sistemática de virus no sangue, durante vários dias consecutivos à inoculação, por dosagem de virus no sangue ou em orgãos nos quais a capacidade de multiplicação é previamente conhecida para outros animais; em se tratando do virus neurotrópico, logicamente o orgão de preferência escolhido será o cérebro. Quanto à pesquisa sistemática de virus no sangue, devemos estabelecer, de antemão, que a presença do virus no dia imediato á inoculação não tem um significado especial como demonstração de um processo multiplicativo, podendo ser apenas resultante de uma eliminação. Para que haja certeza de que se trata de multiplicação, é necessário a presença de virus durante alguns dias no sangue, e, melhor ainda, um aumento gradativo deste, a partir dos primeiros dias post-inoculação.

O sangue seria, neste caso, um indicador preciso, dos processos íntimos passados nos recessos dos tecidos. Quando as barreiras naturais não teem poder suficiente para exterminar imediatamente o virus inoculado, haverá multiplicação deste nos tecidos, o que redundará na morte do animal ou numa posterior imunização.

Às vezes, e este é o caso de pintos, há multiplicação do virus no sistema nervoso, mas sem afetar o estado geral do animal que normalmente sobrevive e não demonstra mesmo qualquer sintoma que possa ser imputado como sinal de infecção.

* Recebido para publicação a 1 de março e dado à publicidade em abril de 1943.

Este problema de animais suscetiveis e não suscetiveis, tomou grande incremento após a descoberta da febre amarela silvestre, atingindo o acmé com a hipótese, de serem as aves depositários naturais de virus e possiveis propagadoras de epidemias de febre amarela silvestre.

Nesse trabalho relatamos os resultados das passagens de virus em série, de cérebro a cérebro de pinto através de 80 gerações, o desenvolvimento de anticorpos após a inoculação por diversas vias, a pesquisa do virus no sangue e diversos orgãos, assim como ligeira noção de avitaminose experimental.

## MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostra de virus.

A amostra de virus usada para a passagem inicial em cérebro de pinto, foi do tipo neurotrópico Francês, obtida de cérebros de camondongos moribundos com encefalite amarílica. Em todas as experiências consecutivas, foram usadas suspensões de cérebros de pintos com virus de passagens, mas em diferentes niveis.

2. Animais de experiência.

*a*) Pintos criados no laboratório, de idade variavel, conforme a experiência.

*b*) Camondongos suiços, adultos ou de 21 dias, usados para pesquisas e dosagens de virus no sangue ou em diversos orgãos.

3. Métodos de infecção dos pintos.

Experiência foram feitas inoculando pintos por via intracerebral, intraperitoneal e intradérmica, com dose variavel, de acordo com a idade e a pesquisa.

4. Verificação da presença de virus.

Para a pesquisa do virus, quer no cérebro quer nos demais orgãos, sacrificamos os pintos com eter, fizemos suspensão a 10 % do material em solução fisiológica e inoculamos 0,03 cm3 por via intracérebral, em camondongos. Para a pesquisa de virus circulante, inoculamos 0,03 cm3 de sangue, pela mesma via, imediatamente após a sangria. Sempre foram inoculados grupos de 6 camondongos.

5. Demonstração de imunidade.

Geralmente, 30 dias após a inoculação, os pintos foram sangrados no coração; separávamos, a seguir, o soro, para verificação da imunidade, por meio de prova de proteção em camondongos jovens (de 19 a 21 dias).

6. Secagem e dosagem.

De quando em vez, com o intuito de preservamos o material contra qualquer eventualidade de posivel perda, costumamos fazer secagem preparando suspensão a 20 % de cérebros, em solução a 50 % de um soro normal humano ou de macaco e, secando no vácuo a baixa temperatura. O material seco é conservado em empolas fechadas e guardado na geladeira. As dosagens foram feitas diluindo o material de 1:10 até 1:100.000 e inoculando para cada diluição um grupo de 6 camondongos com 0,03 cm3 por via intracerebral. Os títulos foram calculados pelo método de Munch.

7. Métodos de observação e cuidado dos animais.

Em geral, os pintos foram guardados, durante todo o período da experiência, em gaiolas de tela com um compartimento de madeira aquecido por lâmpada.

Foram numerados com esparadrapo enrolado em uma das pernas, e diariamente observados.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 1.ª *Parte*

*Inicio e continuação das passagens em série nos pintos.*

A tentativa de estabelecer passagens em série, foi iniciada preparando uma suspensão a 10 %, em solução salina, de cérebros de camondongos moribundos, inoculados com virus neurotrópico Francês de 561.ª passagem.

A primeira passagem foi feita inoculando 0,06 cm3, intracerebral, em pintos de 5 dias. Estes pintos foram observados durante 30 dias, sendo que um deles foi sacrificado 3 dias após a inoculação, retirado o cérebro e feita suspensão a 10 % em solução fisiológica, sendo ao mesmo tempo inoculado um grupo de 6 camondongos por via intracerebral para controle do virus, e, tambem, pintos para a segunda passagem.

As passagens sucessivas, foram, normalmente, feitas com 3 dias de intervalo; foram feitas inoculações sistemáticas dos cérebros e do sangue dos pintos de cada passagem, nos camondongos, e, em geral, todos morreram de encefalite, entre o 5.º e 10.º dia.

Usamos para as passagens, pintos entre recem-nascidos e 5 dias de idade; tais pintos foram inoculados por via intracerebral, com 0,03 cm3 a 0,06 cm3 de acordo com a idade, o que correspondeu, em média, entre 500 a 1.000 D. M. M. para camondongos.

Fizemos 81 passagens e sempre foi evidenciada a presença de virus no cérebro do pinto, por inoculação em camondongos.

As diversas dosagens, feitas com material fresco ou seco, deram título variavel entre 500 e 20.000 D. M. M.

108.882 — F. 9

Nenhuma alteração no comportamento do virus foi observada, quer em camondongo quer em macaco. Suspensão a 10 % de cérebro de pinto da 72.ª passagem, foi inoculada por via intracerebral, em Rhesus (0,6 cm3), o qual, 6 dias depois, morreu com encefalite.

Conclusão.

1. Parece-nos, depois de grande número de passagens, ser possivel assegurar a conservação de virus, por tempo indefinido, em cérebro de pintos, quando as passagens são feitas com intervalos de 2 a 5 dias.
2. Após mais de 80 passagens, não notamos modificações no comportamento do virus em camondongo.
3. Não foram tambem verificadas modificações no comportamento do virus para Rhesus.

## 2.ª *Parte*

*Inoculação do virus por via intracerebral.*

1. Suscetibilidade.

A suscetibilidade dos pintos inoculados por via intracerebral é grande, aparentemente quase igual à dos camondongos. Grande número de pintos, inoculados com virus em alta diluição, demonstrou ter, não só adquirido imunidade, como tambem virus circulante nos primeiros dias post-inoculação. Assim a inoculação de 1,7 D. M. M. (para camondongo) deu virus circulante em 2 pintos e anticorpos protetores em um deles (Ver quadro II).

**QUADRO N. I**

RESULTADOS DAS PESQUISAS DE VIRUS CIRCULANTE EM PINTOS INOCULADOS POR VIA INTRACEREBRAL

| PINTOS INOC. | | SUMÁRIO DA CIRCULAÇÃO DO VIRUS | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N. | Idade | N. de camondongos x | 1º dia | 2º dia | 3º dia | 4º dia | 5º dia | 6º dia | N. de pintos s/ virus circulante |
| 8 | 0–1 dias | n. camon. inf. n. camon. inoc. | 8/44 | 20/45 | 37/46 | 18/38 | 4/32 | 2/28 | 1 |
| | | % camon. inf. | 18% | 44.5% | 80.5% | 47.4% | 12.5% | 7% | |
| 28 | 2 dias | n. camon. inf. n. camon. inoc. | 61/115 | 111/155 | 126/161 | 118/156 | 71/145 | 13/80 | 1 |
| | | % camon. inf. | 53% | 71.6% | 78% | 75.6% | 49% | 16% | |
| 17 | 5 dias | n. camon. inic. n. camon. inf. | 77/91 | 68/93 | 60/95 | 22/92 | 10/95 | 1/94 | 0 |
| | | % camon. inf. | 84.6% | 73% | 63% | 24% | 10.5% | 1.1% | |

x Inoculação de grupos de 6 camondongos e por dia de sangria, para cada soro de pinto.

2. Virus circulante.

Em um grupo de 53 pintos, de idade variavel entre recem-nascidos e 5 dias, foi inoculado virus em dose variavel entre 100 e 1.000 D. M. M. Tais pintos foram, em geral, sangrados até o 6.º dia post-inoculação, para pesquisa de virus circulante. Alta percentagem (96%) de pintos, demonstrou virus na circulação. Os resultados, se bem que não sejam absolutos, mostram variações na presença do virus em relação com a idade. Os pintos com 5 dias teem, possivelmente, menor período de circulação (Quadro n. I).

Uma segunda experiência de carater mais concludente foi feita para verificar a relação entre a quantidade de virus inoculado e a infecção resultante, evidenciada pelo virus circulante e a imunidade.

Um lote de 14 pintos, com 2 dias de idade, foi inoculado com 0,03 cm3 intracerebral de doses decrescentes de virus neurotrópico Francês, da 16.ª passagem em cérebro de pinto e cujo título, para camondongos, foi de 17.800 D. M. M.

Estes pintos foram sangrados nos 5 primeiros dias post-inoculação e o sangue injetado imediatamente depois no cérebro de camondongos, para pesquisa de virus circulante. Decorridos 30 dias, os pintos sobreviventes foram novamente sangrados, e com os soros foram feitos testes imunológicos.

Os resultados obtidos demonstraram que, se por um lado, em baixa diluição, o virus no sangue pode ser apenas resultante de eliminação, por outro lado, virus circulante em animal inoculado com alta diluição, deve ser devido à multiplicação.

Assim, por exemplo, um pinto que recebera menos de 2 D. M. M. apresentou virus circulante nos 5 dias em que foi sangrado. Verificamos, outrossim, que foi possivel imunizar pintos com pequena quantidade de virus, inoculado por via intracerebral, certamente porque houve multiplicação. Os resultados desta experiência estão resumidos no quadro II.

3. Distribuição do virus.

*a*) Tempo de persistência do virus no cérebro:

Com o intuito de verificarmos por quanto tempo seria possivel isolar virus do cérebro dos pintos que receberam virus por esta via, inoculamos um lote de pintos e retiramos os cérebros do 7.º ao 16.º dia post-inoculação. Fizemos suspensão a 10 % em solução fisiológica e inoculamos para cada cérebro, um grupo de 6 camondongos por via intracerebral. Conseguimos isolar virus até o 15.º dia post-inoculação. E' possivel que o virus possa, em alguns casos, persistir por mais uns dias. (Esta experiência é narrada com mais detalhes no capítulo : Desenvolvimento da imunidade). (Ver o quadro n. IV).

**QUADRO N. II**

RESULTADOS DA INOCULAÇÃO DE VIRUS POR VIA I. C. EM DOSES DECRESCENTES, EM PINTOS DE 2 DIAS DE IDADE

| N. DA SÉRIE | D. M. M. INOC. | RESULTADOS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | VIRUS CIRCULANTE NO: | | | | | PROVA DE PROTEÇÃO |
| | | 1º dia | 2º dia | 3º dia | 4º dia | 5º dia | |
| 665 | 17.800 | 6/6 | 4/4 | 6/6 | 6/6 | 2/6 | Posit. 6/6 |
| 666 | 17.800 | 5/5 | 6/6 | 6/6 | 5/5 | 4/6 | — |
| 667 | 1.780 | 3/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | Posit. 6/6 |
| 668 | 1.780 | 0/6 | 5/6 | 2/6 | 2/6 | 0/6 | — |
| 669 | 178 | 0/6 | 1/6 | 6/6 | 6/6 | 1/6 | Posit. 6/6 |
| 670 | 178 | 1/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 4/6 | Posit. 6/6 |
| 671 | 17,8 | 2/6 | 4/6 | 0/6 | 5/6 | 6/6 | — |
| 672 | 17,8 | 0/6 | 5/5 | 6/6 | 6/6 | 2/6 | Posit. 6/6 |
| 673 | 1,7 | 1/6 | 5/6 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | Posit. 6/6 |
| 674 | 1,7 | 0/5 | 4/5 | 0/6 | 1/6 | 0/6 | Negat. 0/6 |
| 675 | > 1 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/5 | — |
| 676 | > 1 | 0/6 | 0/6 | 0/4 | 0/6 | 0/6 | Negat. 0/6 |
| 677 | — | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | — |
| 678 | — | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | Negat. 1/6 |

*b*) Pesquisa de virus em diversos orgãos.

Tentamos, nesta experiência, isolar o virus de diversos orgãos, verificando assim sua difusão pelo organismo. Para tal fim, inoculamos um lote de 22 pintos, de idade variavel entre recem-nascidos e 2 dias, com 0,03 cm3 intracerebral, de suspensão a 10 % de virus neurotrópico da 58.ª e 60.ª passagem em cérebro de pintos, e que correspondeu a ± 200 D. M. M. Foi feita sangria diária, a partir do dia imediato à inoculação, para pesquisa de virus circulante. Sacrificamos, em geral, 2 pintos por dia e retiramos cérebro, pulmão, fígado, baço e rim. Tais orgãos foram triturados em gral, suspensos em solução fisiológica e inoculados em grupos de camondongos.

Resultados :

Foi isolado virus nos diversos orgãos pesquisados, nos primeiros dias post-inoculação; entretanto, apenas uma vez foi evidenciado ao mesmo tempo em que todos os orgãos, sendo, em geral, encontrado apenas em um ou dois. Pequena quantidade de virus foi evidenciada em alguns dos orgãos de dois pintos, sem, no entanto, ter sido encontrado neste dia no sangue. A partir do 6.º dia, o virus foi evidenciado apenas no cérebro. Provavelmente, o virus isolado dos orgãos é proveniente do sangue que neles circula. O cérebro, é, possivelmente, o único local verdadeiro da infecção. O quadro n. III resume estes resultados.

## QUADRO N. III

RESULTADOS DAS EXPERIENCIAS EM PINTOS INOCULADOS POR VIA INTRACEREBRAL COM ± 200 D. M. M.

| NÚMERO DA SÉRIE | PESQUISA DE VIRUS CIRCULANTE NOS DIAS | | | | | | | | | | DISTRIBUIÇÃO DE VIRUS | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1.º | 2.º | 3.º | 4.º | 5.º | 6.º | 7.º | 8.º | 9.º | 10.º | Cérebro | Pulmão | Fígado | Baço | Rim |
| P. 1654 | 2/6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 4/6 | 0/6 | 1/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1727 | 0/6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 3/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 1/6 |
| P. 1601 | — | 4/5 | — | — | — | — | — | — | — | — | 6/6 | 0/6 | 0/5 | 0/5 | 2/6 |
| P. 1602 | — | 3/6 | — | — | — | — | — | — | — | — | 6/6 | 0/4 | 0/5 | 0/6 | 2/6 |
| P. 1726 | 0/6 | 2/4 | — | — | — | — | — | — | — | — | 4/6 | 0/6 | 2/6 | 0/6 | 1/5 |
| P. 1605 | — | 4/6 | 5/6 | — | — | — | — | — | — | — | 4/4 | 2/6 | 0/6 | 1/5 | 0/4 |
| P. 1728 | 0/6 | 2/6 | 6/6 | — | — | — | — | — | — | — | 6/6 | 3/6 | 0/6 | 2/6 | 1/6 |
| P. 1606 | — | 4/4 | 6/6 | 3/6 | — | — | — | — | — | — | 6/6 | 0/5 | 5/6 | 1/6 | 0/6 |
| P. 1729 | 3/6 | 5/6 | 6/6 | 6/6 | — | — | — | | — | — | 6/6 | 6/6 | 5/6 | 6/6 | 4/6 |
| P. 1607 | — | 2/5 | 3/6 | 1/6 | 0/6 | — | — | — | — | — | 4/4 | 0/6 | 0/6 | 0/5 | 0/6 |
| P. 1612 | — | 2/6 | 2/4 | 2/6 | 3/6 | — | — | — | — | — | 5/6 | 0/6 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| P. 1730 | 0/5 | 3/6 | 5/5 | 2/5 | 0/5 | — | — | — | — | — | 6/6 | 0/6 | 0/6 | 0/5 | 0/6 |
| P. 1608 | — | 1/6 | 6/6 | 5/6 | 1/5 | 0/6 | — | — | — | — | 5/5 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1731 | 0/5 | 3/4 | 5/6 | 2/5 | 0/4 | 0/6 | — | — | — | — | 5/5 | 1/6 | 0/6 | 1/5 | 0/5 |
| P. 1609 | — | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/5 | 0/4 | 0/6 | — | — | — | 6/6 | 0/6 | 0/6 | 0/5 | 0/6 |
| P. 1732 | 3/6 | 2/6 | 5/6 | 2/6 | 2/5 | 2/6 | 0/6 | — | — | — | 5/5 | 0/6 | 0/3 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1610 | — | 2/4 | 2/6 | 3/6 | 4/4 | 2/5 | 0/6 | 0/5 | — | — | 4/4 | 0/5 | 0/4 | 0/4 | 0/5 |
| P. 1733 | 2/4 | 3/5 | 4/5 | 2/6 | 0/6 | 0/5 | 0/6 | 0/6 | — | — | 6/6 | 0/5 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1611 | 2/5 | 2/5 | 4/5 | 5/5 | 3/6 | 3/6 | 0/6 | 0/5 | 0/6 | — | 4/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1734 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/4 | 0/6 | 1/5 | 0/6 | 0/6 | 0/5 | — | 6/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1613 | — | 2 6 | 4 6 | 3/5 | 2/6 | 1/6 | 0/6 | 0 4 | 0/6 | 0/6 | 6/6 | 0/4 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1735 | 0.6 | 2.6 | 6/6 | 6/6 | 2/6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0 6 | 0/6 | 5/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/4 |

4. Desenvolvimento da imunidade.

*a*) Resultado das provas de proteção post-inoculação.

Cerca de 50 pintos, entre recem-nascidos e 5 dias de idade, foram inoculados por via intracerebral com 0,03 cm3 de suspensão a 10 % de virus neurotrópico de diversas passagens em pintos, correspondente a ± 500 D. M. M. Decorridos 30 dias, todos os animais foram sangrados e os soros postos em prova de proteção com camondongos jovens. Os resultados obtidos foram todos positivos.

Parece-nos uma questão resolvida, que pintos inoculados por via intracerebral, com virus de passagens em cérebros de pintos, adquirem anticorpos protetores na imensa maioria dos casos.

Na experiência em que inoculamos doses decrescentes de virus (Ver quadro n. II) observamos que, apenas com uma exceção, os pintos que mostraram virus circulante tornaram-se imunes, o que demonstra ser a imunidade um bom indicador de que a infecção se processou. Entretanto, sua ausência não exclue a hipótese de ter havido uma infecção mínima anterior.

*b*) Tempo médio necessário para o aparecimento de anticorpos no sangue.

Nosso intuito nesta observação, é verificar quando começa o aparecimento de anticorpos no sangue, em quantidade suficiente para dar prova de proteção positiva, e, ao mesmo tempo, se é possivel obter virus no cérebro e anticorpos protetores no soro. Para tal fim, inoculamos um lote de 24 pintos, de 1 a 3 dias de idade, com 0,03 cm3 de suspensão a 10 % de virus de passagem, correspondendo a ± 500 D. M. M. A colheita do sangue foi iniciada a partir do 7.º dia; os cérebro dos animais sangrados foram retirados e, após ser feita a suspensão a 10 % em solução fisiológica, foram inoculados em camondongos (Quadro n. IV).

Dos resultados obtidos tiramos as seguintes conclusões :

O tempo médio necessário para aparecimento de anticorpos protetores evidenciaveis por prova de proteção, varia em torno do 10.º dia post-inoculação.

E' possivel obter-se anticorpos protetores no soro, ao mesmo tempo em que o virus é encontrado no cérebro.

*c*) Influência da idade no processo de imunização :

Após havermos verificado que pintos até 5 dias de idade apresentam anticorpos protetores em elevada percentagem, restava saber se, com a idade, esta capacidade de produção seria diminuida ou mesmo abolida.

Inoculamos um lote de 14 pintos com 35, 28, 25, 20 e 15 dias de idade, por via intracerebral, com dose média de ± 1.500 D. M. M. (Quadro n. V).

**QUADRO N. IV**

RESULTADOS DAS PESQUISAS DO TEMPO MÉDIO NECESSÁRIO PARA O APARECIMENTO DE ANTI-CORPOS, APÓS INOCULAÇÃO I. C. DE VIRUS

| NÚMERO DA SÉRIE | DIAS POST-INOCULAÇÃO | INOCULAÇÃO DO CÉREBRO | PROVA DE PROTEÇÃO |
|---|---|---|---|
| P. 1008 | 7° dia | 6/6 | 3/6 |
| P. 1009 | 7° dia | 5/5 | 0/6 |
| P. 1010 | 8° dia | 6/6 | 0/6 |
| P. 1011 | 8° dia | 6/6 | 2/6 |
| P. 2255 | 9° dia | — | 1/6 |
| P. 2256 | 9° dia | — | 0/6 |
| P. 2257 | 9° dia | — | 2/6 |
| P. 2258 | 9° dia | — | 1/6 |
| P. 1012 | 9° dia | 6/6 | 0/6 |
| P. 1013 | 9° dia | 6/6 | 0/6 |
| P. 1014 | 10° dia | 6/6 | 5/6 |
| P. 1015 | 10° dia | 4/4 | 5/6 |
| P. 931 | 10° dia | — | 2/6 |
| P. 1016 | 11° dia | 5/6 | 1/6 |
| P. 1017 | 11° dia | 4/4 | 5/5 |
| P. 1018 | 12° dia | 2/5 | 6/6 |
| P. 1019 | 12° dia | 3/5 | 2/6 |
| P. 1020 | 13° dia | 3/5 | 2/6 |
| P. 1021 | 13° dia | 1/5 | 6/6 |
| P. 1022 | 14° dia | 0/6 | 6/6 |
| P. 1024 | 15° dia | 4/6 | 4/6 |
| P. 1025 | 15° dia | 1/6 | 2/6 |
| P. 1026 | 16° dia | 0/5 | 5/6 |
| P. 1055 | 17° dia | — | 6/6 |

Sangrados 30 dias depois e os soros postos em prova de proteção, todos deram resultados positivos, com apenas uma exceção. Provalmente é possivel obtermos prova de proteção positiva, mesmo nos animais adultos, quando inoculados por via intracerebral.

**QUADRO N. V**

RESULTADOS DAS PROVAS DE PROTEÇÃO EM PINTOS DE IDADE VARIAVEL ENTRE 15 E 35 DIAS

| NÚMERO DA SÉRIE | IDADE EM DIAS | D. M. M. INOCULADA | PROVA DE PROTEÇÃO |
|---|---|---|---|
| 1201 | 35 dias | ± 2.000 | Negat. 0/6 |
| 1202 | 35 dias | ± 2.000 | Posit. 6/6 |
| 1203 | 35 dias | ± 1.500 | Posit. 6/6 |
| 1204 | 28 dias | ± 1.500 | Posit. 6/6 |
| 1205 | 28 dias | ± 1.500 | Posit. 6/6 |
| 1206 | 28 dias | ± 1.500 | Posit. 6/6 |
| 1207 | 28 dias | ± 1.500 | Posit. 6/6 |
| 2169 | 25 dias | ± 1.500 | Posit. 6/6 |
| 2170 | 25 dias | ± 1.500 | Posit. 6/6 |
| 2176 | 20 dias | ± 1.000 | Posit. 6/6 |
| 2177 | 20 dias | ± 1.000 | Posit. 6/6 |
| 2179 | 20 dias | ± 1.000 | Posit. 6/6 |
| 2552 | 15 dias | ± 1.000 | Posit. 6/6 |
| 2566 | 15 dias | ± 1.000 | Posit. 5/6 |

*SUMMARY OF INTRACEREBRAL INOCULATION*

1. Chicks have great susceptibility, apparently nearly equal to that of mice. 1.7 mouse doses caused circulating virus in both chicks; antibodies in one (Table II).

2. Circulating virus :

With anything more than minimal doses apparently significant concentration of virus circulate at some time during first six days in most (96 %) of chicks of 0-5 days (Table I); questionably signi-

ficant variations in circulating virus with respect to age in first five days; five days chicks have possibly shorter period of circulation. With the smaller doses the peak appearance may be delayed to 2nd or 3rd day (Table II).

3. Virus distribution :
   *a*) Virus persists in brain up to days post-inoculation (Table IV).
   *b*) During first six days virus occasionally found in lung, liver, spleen, kidney; the extent of such virus being more or less correlated with presence of significant circulating virus. After 6th day no virus in circulating blood, and none in tissues other than brain (Table III).
   *c*) This makes it clear that brain is primary, and probably only true site of infection.

4. Development of immunity:
   *a*) With ± 500 M. L. D. i.c., 100 per cent of 50 chicks have positive (6/6) protection tests after 30 days.
   *b*) In single titration experiment (Table II), with one exception, chicks showing circulating virus became immune. Therefore, immunity is a good index that infection has been estabilished. Absence, however, may not exclude prior minimal infection.
   *c*) Detectable immune bodies appear by 10 th day, at a time when many of the same chicks still have virus in brain (Table IV).
   *d*) Even up to 35 days of age, chicks inoculated intracerebrally become immune (Table V).

3.ª *Parte*

*Inoculação intraperitoneal.*

1. Suscetibilidade.

Para verificarmos á suscetibilidade de pintos que receberam virus por via intraperitoneal, fizemos uma experiência inoculando doses decrescentes de virus e tomando para indicador da sensibilidade os resultados obtidos em provas de proteção com os soros colhidos 30 dias depois da inoculação. Procuramos ainda verificar, na mesma experiência, se a inoculação intracerebral de goma de amido poderia ter alguma influência nos posteriores resultados imunológicos, servindo para aumentar a percentagem dos resultados positivos.

Para esta experiência separamos 2 lotes de pintos com um dia de idade, e, num deles, inoculamos no cerebro 0,03 cm3 de goma de amido a 2 %; em seguida, todos receberam suspensão de virus em doses decrescentes, por

via intraperitoneal. Os resultados (Quadro n. VI) foram mais ou menos idênticos e parece-nos que por esta via há influências individuais maiores que por via i.c., facilitando ou dificultando a produção de anticorpos. Assim, se, por um lado, o pinto 956, que recebeu 1.000 D. M. M. não demonstrou ter adquirido anticorpos, por outro lado o pinto 990, que recebera apenas 2 D. M. M., teve um soro fortemente positivo.

Por esta experiência verificamos a irregularidade nas respostas de pintos muito novos a doses decrescentes de virus, e, ainda mais, a demonstração de que tais animais são menos suscetiveis quando inoculados por via i. p. que por via i.c. Outrossim, verificamos que o traumatismo cerebral produzido pela inoculação de goma no cérebro, não aumentou a suscetibilidade.

Esta suscetibilidade irregular é tambem vista nos estudos que se seguem sobre virus circulante e imunidade; estes estudos ainda mostram a nítida redução na suscetibilidade com o aumento da idade dos animais.

**QUADRO N. VI**

RESULTADOS DA INOCULAÇÃO INTRAPERITONEAL DE DOSES DECRESCENTES DE VIRUS EM PINTOS DE UM DIA, COM OU SEM TRAUMATISMO CEREBRAL

| GOMA INTRACEREBRAL | | | SEM GOMA | | |
|---|---|---|---|---|---|
| N. DA SÉRIE | D. M. M. INOCULADA | PROVA DE PROTEÇÃO | N. DA SÉRIE | D. M. M. INOCULADA | PROVA DE PROTEÇÃO |
| p. 778 | 1.500 | 5/6 | p. 782 | 1.500 | 6/6 |
| p. 956 | 1.000 | 1/6 | p. 962 | 1.000 | 6/6 |
| p. 986 | 200 | 6/6 | p. 963 | 1.000 | 6/6 |
| p. 958 | 100 | 6/6 | p. 999 | 200 | 6/6 |
| p. 959 | 100 | 6/6 | p. 964 | 100 | 6/6 |
| p. 987 | 20 | 0/6 | p. 995 | 20 | 6/6 |
| p. 988 | 20 | 0/6 | p. 996 | 20 | 6/6 |
| p. 960 | 10 | 6/6 | p. 955 | 10 | 0/6 |
| p. 961 | 10 | 0/6 | — | — | — |
| p. 989 | 2 | 0/6 | p. 997 | 2 | 0/6 |
| p. 990 | 2 | 6/6 | p. 998 | 2 | 0/6 |
| p. 991 | 1 | 0/6 | p. 994 | 1 | 0/6 |
| p. 992 | 1 | 0/6 | p. 1000 | 1 | 0/6 |

2. Virus circulante.

Para pesquisa de virus circulante inoculamos um lote de 39 pintos, sendo 30 com idade máxima de 2 dias e nove de 9 dias, os quais receberam

500 a 1.500 D. M. M. Tais pintos foram sangrados no coração, geralmente, durante os 6 primeiros dias post-inoculação e o sangue imediatamente inoculado no cérebro de um grupo de 6 camondongos.

Pudemos observar os seguintes resultados (Quadro n. VII) :

*a*) Pintos inoculados por via i.p. com idade variavel entre recem-nascidos e 2 dias, mostram nivel de virus circulante, durante os 6 primeiros dias post-inoculação, aproximadamente igual ao dos pintos que receberam virus por via i.c. O virus foi evidenciado em 93% dos 30 pintos inoculados.

*b*) Com os pintos de 9 dias os resultados foram muito inferiores; apenas 4 pintos, dentre os 9, mostraram virus circulante, porem em nivel tão baixo que não deu a impressão de ter havido multiplicação do virus.

**QUADRO VII**

RESULTADOS DAS PESQUISAS DE VIRUS CIRCULANTE EM PINTOS INOCULADOS POR VIA INTRA-PERITONEAL

| PINTOS INOC. | | SUMÁRIO DA CIRCULAÇÃO DO VIRUS | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N. | Idade | N. de camondongos | 1º dia | 2º dia | 3º dia | 4º dia | 5º dia | 6º dia | N. de pintos s/virus circulante |
| 17 | 0–1 dias | n. camon. inf<br>n. camon. inoc. | 21/96 | 39/92 | 60/96 | 61/91 | 27/77 | 4/71 | 1 |
| | | % canon. inf. | 22% | 42% | 62,5% | 67% | 35% | 5,6% | |
| 13 | 2 dias | n. camon. inf.<br>n. camon. inoc. | 19/72 | 26/73 | 43/71 | 54/73 | 21/75 | 6/70 | 1 |
| | | % camon. inf. | 26% | 35,6% | 60,5% | 74% | 28% | 8,5% | |
| 9 | 9 dias | n. camon. inf.<br>n. camon. inoc. | 6/50 | 1/54 | 2/54 | 5/47 | 0/41 | 0/41 | 5 |
| | | % camon. inf. | 12% | 2% | 4% | 10,6% | 0% | 0% | |

3. Distribuição de virus.

Em um lote de 22 pintos recem-nascidos, inoculamos 0,02 cm3 i. p. de suspensão a 10 % de virus neurotrópico de 55.ª e 61.ª passagens em cérebro de pintos, correspondendo a ± 1.500 D. M. M. Todos os pintos foram sangrados diariamente, e sacrificamos, em geral, 2 por dia, do 1.º ao 10.º dia, para pesquisarmos virus no cérebro, pulmão, fígado, baço e rim.

Foram obtidos os seguintes resultados (Quadro n. VIII):

*a*) Durante os primeiros 4 dias, o virus foi irregularmente encontrado no pulmão, fígado, baço e rim, em proporção mais ou menos equivalente ao virus circulante. Neste período não foi evidenciado o virus no cérebro.

## QUADRO VIII

RESULTADOS DAS EXPERIENCIAS EM PINTOS INOCULADOS POR VIA INTRAPERITONEAL COM ± 1.500 D. M. M.

| NÚMERO DA SÉRIE | PESQUISA DE VIRUS CIRCULANTE NOS DIAS | | | | | | | | | | DISTRIBUIÇÃO DO VIRUS | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1.º | 2.º | 3.º | 4.º | 5.º | 6.º | 7.º | 8.º | 9.º | 10.º | Cérebro | Pulmão | Fígado | Baço | Rim |
| P. 1415 | 2/5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0/5 | 1/5 | — | 0/6 | — |
| P. 1805 | 2/4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0/6 | 0/6 | 0/5 | 2/6 | 2/6 |
| P. 1426 | 0/6 | 2/6 | — | — | — | — | — | — | — | — | 1/6 | 1/5 | 2/5 | 1/6 | 0/6 |
| P. 1806 | 3/6 | 4/6 | — | — | — | — | — | — | — | — | 0/6 | 2/6 | 4/6 | 1/6 | 2/6 |
| P. 1424 | 1/6 | 1/6 | 3/6 | — | — | — | — | — | — | — | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/5 |
| P. 1807 | 2/6 | 3/5 | 5/6 | — | — | — | — | — | — | — | 0/3 | 0/6 | 5/6 | 0/6 | 2/5 |
| P. 1416 | 3/6 | 5/6 | 5/6 | 3/4 | — | — | — | — | — | — | 0/6 | 1/6 | 6/6 | 6/6 | 2/6 |
| P. 1808 | 0/5 | 1/6 | 1/5 | 0/6 | — | — | — | — | — | — | 0/5 | 1/4 | 2/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1417 | 2/6 | 4/5 | 5/5 | 5/5 | 1/6 | — | — | — | — | — | 6/6 | 1/6 | 1/6 | 3/6 | 6/6 |
| P. 1809 | 2/4 | 3/6 | 3/6 | 6/6 | 0/5 | — | — | — | — | — | 4/6 | 0/6 | 3/4 | 3/6 | 1/6 |
| P. 1418 | 0/6 | 1/6 | 2/6 | 1/5 | 3/6 | 1/6 | — | — | — | — | 0/6 | 2/5 | 0/6 | 1/5 | 0/3 |
| P. 1419 | 5/6 | 3/5 | 5/6 | 4/5 | 4/6 | 1/6 | — | — | — | — | 6/6 | 3/6 | 0/5 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1813 | 3/6 | 3/6 | 5/5 | 6/6 | 3/6 | 0/6 | — | — | — | — | 6/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1420 | 0/6 | 3/6 | 6/6 | 5/6 | 1/5 | 0/6 | 0/5 | — | — | — | 6/6 | 0/6 | 2/4 | 2/6 | 0/5 |
| P. 1810 | 3/6 | 2/6 | 5/6 | 6/6 | 1/5 | 0/6 | 0/5 | — | — | — | 6/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/5 |
| P. 1422 | 0/6 | 5/6 | 2/6 | 2/6 | 4/5 | 2/5 | 1/5 | 0/5 | — | — | 6/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1421 | 0/5 | 1/5 | 5/5 | 5/5 | 1/6 | 0/5 | 1/6 | 0/5 | — | — | 6/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1811 | 1/5 | 2/4 | 4/6 | 6/6 | 5/5 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | — | — | 5/6 | 0/6 | 0/5 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1423 | 0/6 | 1/4 | 3/6 | 4/6 | 3/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | — | 6/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/5 |
| P. 1425 | 0/6 | 0/6 | 1/4 | 2/5 | 1/5 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/5 | — | 4/6 | 0/6 | 0/5 | 0/6 | 0/5 |
| P. 1412* | 0/6 | 0/5 | 0/5 | 0/6 | 0/5 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/5 | — | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |
| P. 1814 | 0/4 | 2/5 | 3/6 | 6/6 | 2/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/5 | 5/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 |

(*) Provavelmente não houve infecção.

*b*) Do 5.º ao 10.º dia, apenas com duas exceções, todos os pintos mostraram virus no cérebro. Dos 2 supracitados, um não mostrou virus circulante, e o outro sempre apresentou pequena quantidade de virus circulante.

*c*) Depois do 7.º dia, os pintos não evidenciaram virus em outro orgão a não ser o cérebro, assim como não mais isolamos virus do sangue.

*d*) Tais resultados parecem indicar que depois da inoculação i.p., há uma multiplicação inicial do virus em local indeterminado, resultando na circulação do virus, e que a infecção cerebral é proveniente deste virus na circulação; tal fato é constatado na grande maioria de pintos de 0-2 dias de idade, o que prova serem tambem bastante suscetiveis por esta via.

4. Desenvolvimento da imunidade.

*a*) Em um lote de 26 pintos, com idade variavel entre recem-nascidos e 2 dias, inoculamos 0,2 cm3 de suspensão de cérebros de pintos com virus de diversas passagens, os quais receberam de 100 a 3.000 D. M. M.

Decorrido um mês, todos os animais foram sangrados e os soros postos em prova de proteção. Obtivemos 23 resultados positivos e 3 negativos; donde podemos concluir que, pintos nos primeiros dias de nascidos, inoculados com o mínimo de 100 D. M. M., podem adquirir anticorpos protetores em percentagem elevada.

*b*) Tempo médio para evidenciação de anticorpos no sangue.

Desejamos observar, nesta experiência, no fim de quantos dias os soros de pintos inoculados por via i.p., apresentam anticorpos em concentração suficiente para neutralizar o virus nas provas de proteção.

Inoculamos 2 lotes de pintos : o primeiro, de 19 pintos, com 1 a 2 dias de idade, recebeu suspensão a 10 % de cérebro da 76.ª passagem, correspondendo a ± 500 D. M. M.; neste lote, sacrificamos os pintos logo após a sangria, retiramos os cérebros e inoculamos em grupos de camondongos, para verificarmos a possibilidade de obtermos virus no cérebro e prova de proteção positiva; por outro lado, inoculamos o sangue recem-colhido de tais pintos no cérebro de camondongos, para pesquisa de virus.

O segundo lote, de 15 pintos, com 6 dias de idade, recebeu suspensão a 10 % de cérebro de pinto da 34.ª passagem, correspondendo a ± 2.000 D. M. M.

No 1.º grupo iniciamos a sangria no 7.º dia e no 2.º grupo a partir do 9.º dia.

Os resultados (Quadro n. IX) foram irregulares, provavelmente porque a imunização, após inoculação de virus por via i.p., é mais influenciada por fatores individuais que quando pintos recebem virus no cérebro. Contudo, 8 dias após inoculação, obtivemos resultado positivo para os pintos mais jovens, e no 10.º dia para os mais velhos.

Se bem que os resultados tenham sido irregulares para as duas séries, são mais regulares para os pintos novos. Assim, apenas 6 soros, dentre os 19, dos pintos de 1 a 2 dias de idade, deram resultados negativos depois de 7.º dia, (e 2 resultados fracamente positivos: 2/6),

**QUADRO N. IX**

RESULTADOS DAS PESQUISAS DO TEMPO MÉDIO NECESSÁRIO PARA O APARECIMENTO DE ANTICORPOS, APÓS INOCULAÇÃO I. P. DE VIRUS

| PINTOS DE 1-2 DIAS INOC. COM ± 500 D. M. M. | | | | | PINTOS DE 6 DIAS INOC. COM ± 2.000 D. M. M. | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | RESULTADOS | | | | | |
| N.º DA SÉRIE | EXAME NO | Pesquisa de virus | | PROVA DE PROTEÇÃO | N.º DE SÉRIE | EXAME NO | PROVA DE PROTEÇÃO |
| | | Sangue | Cérebro | | | | |
| p. 2525..... | 7º dia | 0/6 | 0/6 | 2/6 | — | — | — |
| p. 2526..... | 8º dia | 0/6 | 0/6 | 0/6 | — | — | — |
| p. 2527..... | 8º dia | 0/6 | 1/6 | 6/6 | — | — | — |
| p. 2528..... | 9º dia | 0/6 | 2/6 | 4/6 | p. 2136..... | 9º dia | 0/6 |
| p. 2530..... | 9º dia | 0/6 | 0/5 | 2/6 | p. 1037..... | 9º dia | 1/6 |
| p. 2531..... | 10º dia | 0/6 | 2/6 | 5/6 | p. 1038..... | 10º dia | 5/6 |
| p. 2532..... | 10º dia | 0/6 | 4/6 | 6/6 | p. 1039..... | 10º dia | 5/6 |
| p. 2533..... | 11º dia | 0/6 | 0/6 | 2/6 | p. 1040..... | 11º dia | 0/6 |
| p. 2534..... | 11º dia | 0/6 | 0/6 | 0/6 | p. 1041..... | 11º dia | 5/6 |
| p. 2535..... | 12º dia | — | 0/6 | 6/6 | p. 1042..... | 12º dia | 1/6 |
| p. 2536..... | 12º dia | — | 0/6 | 6/6 | p. 1043..... | 12º dia | 0/6 |
| p. 2537..... | 13º dia | — | 0/6 | 5/6 | p. 1045..... | 13º dia | 0/6 |
| p. 2538..... | 13º dia | — | 0/6 | 0/6 | p. 1046..... | 13º dia | 6/6 |
| p. 2539..... | 14º dia | — | 0/6 | 0/6 | p. 1047..... | 14º dia | 1/6 |
| p. 2540..... | 14º dia | — | 0/6 | 0/6 | p. 1048..... | 14º dia | 0/6 |
| p. 2541..... | 15º dia | — | 0/6 | 6/6 | p. 1051..... | 15º dia | 6/6 |
| p. 2542..... | 15º dia | — | 0/6 | 5/6 | — | — | — |
| p. 2543..... | 16º dia | — | 0/5 | 0/6 | p. 1052..... | 16º dia | 5/6 |
| p 2544..... | 16º dia | — | 0/5 | 6/6 | p. 1053..... | 16º dia | 0/6 |

ao passo que, em 15 soros de pintos com 6 dias, 9 foram negativos a partir do 9.º dia.

Podemos considerar o tempo médio para o aparecimento de anticorpos, o mesmo que para via intracerebral, isto é, o 10.º dia. Tambem foi possivel isolar virus do cérebro de alguns pintos com anticorpos no soro.

c) Influência da idade.

Para estudarmos a influência da idade no processo de imunização, inoculamos um lote de 14 pintos de 8 a 25 dias de idade, com 1.000 a 3.000 D. M. M. Todos foram sangrados 30 dias após à inoculação e os soros postos em prova de proteção (Quadro n. X).

Obtivemos apenas um resultado positivo a partir do 15.º dia. Pintos com 8, 9 e 10 dias mostraram resultados irregulares. E' provavel que, alem da idade, que asseguraria melhores defesas nas barreiras do sistema nervoso central, outros fatores individuais venham influir

**QUADRO N. X**

RESULTADOS DAS PROVAS DE PROTEÇÃO EM PINTOS DE 8 A 25 DIAS DE IDADE

| NUMERO DA SÉRIE | IDADE EM DIAS | D. M. M. INOCULADA | PROVA DE PROTEÇÃO |
|---|---|---|---|
| 2172 | 25 dias | ± 3.000 | 0/6 |
| 2174 | 25 dias | ± 3.000 | 0/6 |
| 2180 | 20 dias | ± 3.000 | 0/6 |
| 2182 | 20 dias | ± 3.000 | 0/6 |
| 511 | 15 dias | ± 1.000 | 0/6 |
| 512 | 15 dias | ± 1.000 | 0/4 |
| 513 | 15 dias | ± 1.000 | 0/6 |
| 515 | 15 dias | ± 1.000 | 0/6 |
| 520 | 15 dias | ± 1.000 | 4/6 |
| 858 | 10 dias | ± 1.500 | 5/6 |
| 853 | 9 dias | ± 1.500 | 4/6 |
| 1218 | 9 dias | ± 1.500 | 1/6 |
| 1219 | 9 dias | ± 1.500 | 6/6 |
| 851 | 8 dias | ± 1.500 | 0/6 |

nos resultados, como, por exemplo, uma absorção lenta e maior capacidade do sangue e do sistema retículo-endotelial, em geral, em destruir o virus.

*SUMMARY OF INTRAPERITONEAL INOCULATION*

1. Susceptibility — Single titration experiment in newly hatchet chicks (Table VI), using subsequent immunity as index, shows irregular response to graded virus doses, and indicates that chick is less susceptible by this route than by intracerebral. Same experiment fails to suggest that cerebral injury, by intracerebral starch inoculation, increases intraperitoneal susceptibility. This irregular susceptibility also shown in following circulating virus and immunity studies. These studies also show marked reduction in susceptibility with age.
2. Circulating virus.
   *a*) Chicks of 0-2 days inoculated with 500-1.500 M.L.D., of virus intraperitoneally show levels of circulating virus during the first six days nearly equal to those of chicks inoculated intracerebrally (Table VII). Virus observed in 93 per cent of 30 such chicks.
   *b*) 9-day old chicks, however, are very inferior. Only 4 out of 9 showed any virus, and in level appreciably lower.
3. Virus distribution.
   *a*) During first 4 days virus irregularly found in lung, liver, spleen, and kidney and in extent more or less related to amount of circulating virus. In this period brain fails to show virus.
   *b*) From 5th to 10 th day, of the 14 chicks tested, all but two showed significant virus in brain. Of these two, one had shown no circulating virus, and other never showed more than 3/6 virus in blood.
   *c*) After 7th day no chick showed virus in other organs than brain, and no circulating virus was noted.
   *d*) These results suggest after intraperitoneal inoculation, an initial multiplication of virus occurs in an undetermined site, resulting in circulating virus, and that cerebral infection occurs because of this circulating virus in almost all of 0-2 day old chicks. This means that young chicks, then, are quite susceptible to intraperitoneal virus.
4. Immunity.
   *a*) With 100-3.000 M.L.D., i.p., 88 per cent of chicks (of 0-2 days old) shown positive protection test after 30 days.

*b*) In a study of 1-2 day, and 6 day chicks (Table IX) tested at intervals of from 7 to 16 days, it was able to show clear cut antibodies as early as 8 days in the younger chicks, and by the 10th days in the older chicks. However, the results amongst chicks tested at subsequent intervals, although irregular in both series, are much more regular in the younger chicks. Only 6 in 19 of the 1-2 day chicks failed to show significant immunity after the 7th day, while 9 in 15 of the 6-day chicks failed after the 9th day.
Virus was found in the brain of some chicks exhibiting antibodies in the serum.

*c*) In a serie of older chicks from 8 to 25 days, no chicks became immune older than 15 days after 1.000 to 3.000 M.L.D., and only 1 out of 5 of the 15-day chicks, 8, 9, und 10-day chicks show irregular results.

4.ª *Parte*

*Inoculação intradérmica.*

No capítulo anterior verificamos que pintos inoculados por via extra-neural, no caso foi a via i. p., podem apresentar virus circulante e demonstrar o desenvolvimento de imunidade.

Queremos verificar nesta experiência, se pintos inoculados com virus por via intradérmica, adquirem imunidade, e, o que é mais importante, se há circulação e multiplicação do virus. A presença de virus no sangue nem sempre tem importância para provar sua multiplicação. Quando o virus é evidenciado na circulação apenas no 1.º dia post-inoculação, ou nos dois primeiros dias, porem, com uma diminuição gradativa, devemos pensar que, neste caso, trata-se apenas de eliminação (salvo se for muito pequena a quantidade inoculada) e não o resultado da multiplicação no organismo. E' preciso ser demonstrada a presença de virus no sangue, alem da quantidade que deve se esperar pela absorção do conteudo inoculado.

Dividimos um lote de 20 pintos recem-nascidos em duas partes e inoculamos, em 10 deles 0,01 cm3 da diluição 1:10 de virus neurotrópico Francês da 80.ª passagem em pinto, correspondendo a ± 160 D. M. M.; a outra parte recebeu 0,03 cm3 intradérmico, da diluição 1:100 correspondendo a ± 50 D. M. M. Todos os animais foram inoculados na face interna da coxa e formou-se no local uma pequenina bolha. Foram sangrados no 3.º 4.º, 5.º e 6.º dia post-inoculação para pesquisa de virus circulante e decorri-

dos 30 dias novamente sangrados para prova de proteção (Quadro n. XI). Obtivemos os seguintes resultados :

*a*) Dos 10 pintos inoculados com ± 160 D. M. M., dois não evidenciaram virus circulante, e os soros de 3, dentre os quais estes dois, deram resultados negativos nas provas de proteção; um dos pintos com resultados negativo apresentou virus circulante.

*b*) Nos outros 10 pintos, inoculados com ± 50 D. M. M., apenas um não demonstrou virus na circulação, mas deu prova de proteção positiva. Por outro lado, em um pinto no qual circulou virus, a prova de proteção foi negativa, o que contribue, mais uma vez, para demonstrar que apesar da imunidade ser um bom índice de que a infecção foi estabelecida, sua ausência, contudo, não exclue a possibilidade de uma infecção mínima anterior.

*c*) Verificamos, assim, que a maioria de pintos inoculados por via intradérmica com pequena quantidade de virus (50-160 D. M. M.) se infectam.

Os resultados obtidos teem grande importância porque torna possivel levar ao terreno das aves o já vasto estudo sobre depositários de virus.

**QUADRO N. XI**

RESULTADOS DA PESQUISA DE VIRUS CIRCULANTE E PROVAS DE PROTEÇÃO EM PINTOS RECEM-NASCIDOS, INOCULADOS POR VIA INTRADÉRMICA

| PINTOS INOC. COM ± 160 D. M. M. | | | | | | PINTOS INOC. COM ± 50 D. M. M. | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N. da série | RESULTADOS | | | | | N. da série | RESULTADOS | | | | |
| | Dias de sangria | | | | Prova de proteção | | Dias de sangria | | | | Prova de proteção |
| | 3º | 4º | 5º | 6º | | | 3º | 4º | 5º | 6º | |
| 2603 | 1/6 | 2/6 | 2/5 | 2/6 | 6/6 | 2613 | 0/6 | 1/6 | 1/6 | 2/6 | 6/6 |
| 2604 | 4/6 | 2/6 | 0/6 | 0/5 | 6/6 | 2640 | 3/6 | 5/6 | 2/6 | 0/6 | 6/6 |
| 2605 | 5/6 | 2/6 | 1/5 | 0/3 | 6/6 | 2615 | 0/5 | 3/6 | 3/5 | 0/6 | 6/6 |
| 2606 | 5/6 | 1/4 | 0/5 | 0/5 | 0/6 | 2616 | 2/6 | 3/5 | 0/5 | 0/6 | 6/6 |
| 2607 | 0/6 | 1/6 | 1/6 | 1/5 | 6/6 | 2617 | 3/4 | 1/6 | 0/6 | 0/6 | 6/6 |
| 2608 | 0/6 | 1/6 | 0/6 | 1/6 | 6/6 | 2618 | 3/6 | 1/5 | 0/6 | 0/6 | 6/6 |
| 2609 | 0/6 | 1/5 | 2/5 | 1/6 | 6/6 | 2619 | 1/6 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 5/6 |
| 2610 | 0/6 | 0/5 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 2620 | 0/4 | 3/5 | 1/6 | 0/6 | 0/6 |
| 2611 | 0/5 | 0/5 | 0/6 | 0/6 | 0/6 | 2621 | 0/6 | 1/5 | 1/6 | 0/5 | 6/6 |
| 2612 | 0/6 | 2/6 | 0/6 | 0/6 | 5/6 | 2622 | 0/6 | 0/5 | 0/6 | 0/6 | 6 6 |

Nossa intenção inicial foi fazer mosquitos infectados picarem pintos recem-nascidos e sangrá-los diariamente durante os 6 primeiros dias. Com a inoculação intradérmica recorremos a um artifício de técnica, que nos veio mostrar ser muito provavel que, se mosquito infectados picarem pintos recem-nascidos, haverá circulação de virus pelo menos em alguns.

Depois dos estudos de N. C. Davis (Am. J. Trop. Med., 14, 343, 1934) sabemos que mosquitos podem transmitir por picada 100 D. M. M. e talvez mais. Ora, nós inoculamos de 50 a 160 D. M. M., o que corresponde, em média, a uma transmissão por picada de mosquito. Alem disso, o mosquito, em geral, introduz a trompa num capilar, facilitando assim a difusão do virus.

E' pois lógico supor que, se dadas espécies de mosquitos, reconhecidamente capazes de se infectarem com virus amarílico, picarem pintos com virus circulante, possam se infectar e transmitir o virus a outros pintos, e, quiça, a aves recem-nascidas, que neste caso representariam um dos depositários naturais de virus, de grande importância para o Brasil, onde a avifauna é abundantíssima.

*SUMMARY OF INTRADERMAL INOCULATION*

Previous experiments (intraperitoneal) show clearly that chicks can circulate virus when inoculated by an extraneural route, and also can develop immunity.

Brief experiment done to test possibility of developing infection with small intradermal doses such as might be transmitted by a blood sucking insect (Table XI).

*a*) With 0.01 cm3 containing approximately 160 M. L. D., 10 chicks were inoculated intradermally. Two failed to show circulating virus, and 3, including these 2, were found not to have circulating antibodies after 30 days. One chick, which did circulate virus, failed to develop virus.

*b*) With 0.03 cm3 of 10 x less concentrated virus suspension containing about 50 M. L. D., 10 more chicks were similarly inoculated. Only 1 of these failed to show circulating virus, altought it was later found to have antibodies. One of these, however, which did circulate virus, failed to develop antibodies.

*c*) It is thus apparent that the majority of 0-1 day chicks inoculated intradermally with small virus quantities (50-160 M.L.D.) become infected.

5.ª *Parte*

*Breve estudo sobre introdução do virus por via gástrica; pesquisa de virus nas fezes; inoculação de virus em pintos com avitaminose B.*

Nesta parte desejamos relatar os resultados obtidos em experiências que, apesar de feitas com número pequeno de animais, já servem para uma orientação.

1. Pesquisa de anticorpos no soro de pintos que receberam virus por via gástrica.

Em um lote de 8 pintos recem-nascidos, colocamos no estômago, com o auxílio de uma sonda de vidro, 0,20 cm3 de suspensão de virus, correspondente a ± 3.000 D. M. M. Colhidos os soros 30 dias depois, e postos em prova de proteção, todos deram resultados negativos.

Devido ao pequeno número de animais utilizados, não queremos tirar conclusões desta experiência, mas parece-nos que a via gástrica não é favoravel à penetração do virus, impedindo assim a produção de uma posterior imunização; talvez o virus seja destruido rapidamente no estômago ou não seja absorvido através do ducto gastro-intestinal.

2. Pesquisa de virus nas fezes.

Inoculamos um lote de 10 pintos recem-nascidos com suspensão a 10 % de virus da 80.ª passagem, do seguinte modo: 5 pintos receberam ± 500 D. M. M. por via intracerebral, e os outros 5, cerca de 3.000 D. M. M. por via intraperitoneal. Sacrificamos 2 pintos no 3.º dia, 4 pintos no 4.º dia e os 4 restantes no 5.º dia. As fezes colhidas no intestino delgado e grosso, foram trituradas em gral e feitas suspensões a 10 % em solução fisiológica com 2 % de soro normal humano, sendo a seguir, centrifugadas e filtradas em Berkefeld N. Inoculamos 0,03 cm3 de cada filtrado, em um grupo de 6 camondongos, por via intracerebral. Não foi possivel evidenciar virus no material utilizado.

Apesar de ser pequeno o número de observações, dá-nos a impressão de não ser possivel o isolamento de virus nas fezes de pintos após a inoculação por via intracerebral e intraperitoneal.

3. Inoculação de virus em pintos com avitaminose B.

*Objetivo.* Nossa intenção, nesta experiência, foi verificar se haveria possibilidade de obtermos melhores resultados ao inocularmos virus neurotrópico de passagem em cérebro de pinto, quando trabalhamos com animais debilitados e principalmente com o sistema nervoso afetado. A hipovitaminose B, em aves, principalmente em galinhas, não só provoca lesões nervosas periféricas, como, e o que é mais importante, o sistema nervoso central é muito atingido.

*Período prodrômico, sintomatologia e duração da doença.* Inicialmente estudamos o período de incubação, a duração da doença e sintomatologia geral, porque todos os trabalhos que consultamos referem-se apenas a frangos ou aves adultas, não nos sendo possivel encontrar estudos detalhados sobre pintos com poucos dias de idade.

Verificamos que, enquanto com frangos e galinhas, os primeiros sintomas de doença raramente aparecem antes da 3.ª semana depois do início da alimentação especial, em pintos podemos observar início da doença 9 dias após regime carente. O período de doença nestes pintos é muito mais curto em relação a adultos, sendo que, às vezes, 24 horas após o início dos sintomas o animal vem a morrer.

Se, em vez de pintos com apenas 1 ou 2 dias de idade, trabalharmos com pintos de 5 dias, podemos verificar que, apesar da diferença pequena, já é possivel notar aumento no período de incubação e na duração da doença. Por outro lado, verificamos que, em estado adiantado, a volta à alimentação normal não mais faz regredir os sintomas e que no período precomatoso nem mesmo a introdução de vitamina B, por via parenteral, salvará o animal em experimentação.

A sintomatologia é idêntica à dos adultos, apenas em lapso de tempo muito menor : inicia-se, geralmente, com marcha trôpega, titubeante; andam, às vezes, rapidamente para a frente como se houvesse um deslocamento do eixo do equilíbrio. Depois, não mais conseguem manter-se em pé com as pernas erectas, apoiando-se sobre toda a extensão da perna que forma ângulo agudo com a coxa; os dedos estão flectidos; os músculos das asas e pescoço são geralmente atingidos; ficam encolhidos, quietos, as penas eriçadas, a cabeça encostada ao peito; fezes com coloração muito clara. Se não morrem horas depois, a doença progride rapidamente sendo em geral encontrados 24 horas depois, caidos no fundo da gaiola, o pescoço torcido para trás, com profunda dispnéia, que os obriga a manter o bico aberto, dando-nos a visão do quadro exato do período precomatoso da doença de Eijkman.

Nos pintos muito novos o período da doença dura de poucas horas a 2 dias.

*Resultados da experiência.*

A inoculação de virus neurotrópico por via intraperitoneal e intracerebral durante o período de incubação, no início da doença e em um período mais adiantado (suspendendo, a seguir, a alimentação especial) não produziu sintomas que pudessem ser imputados como encefalite amarílica; exames histopatológicos do cérebro, feitos em uma série de animais sacrificados em dias consecutivos, não demonstraram lesões de encefalite por virus. E'

possivel que estudos feitos em larga escala ponham estes resultados em contradição.

6.ª *Parte*

*Patogenicidade.*

Em geral, pintos inoculados por via intracerebral ou intraperitoneal não apresentam sintoma algum de doença.

Alguns pintos, entretanto, nos primeiros dias post-inoculação por via intracerebral, ficam com as penas eriçadas, alimentam-se pouco e permanecem quietos; algum tempo depois nada mais demonstram.

Às vezes alguns veem a sucumbir, mas dificil nos será dizer se a morte é proveniente de infecção amarílica.

No decorrer das últimas passagens, como tivéssemos alguns pintos paralíticos, retiramos o cérebro para exame histopatológico.

Em suma, poude verificar-se que, no sistema nervoso central, houve infiltração interstical e perivascular por linfócitos e alterações degenerativas nas células dos neurônios. Este processo de encefalite foi sempre pouco intenso, e não nos pode dar a segurança de ter sido provocado pelo virus amarílico.

## DISCUSSÃO

O grande número de passagens em série, do virus neurotrópico Francês, demonstrou ser possivel a conservação deste, em cérebro de pintos, nos primeiros dias de nascidos, sem que, no entanto, manifestações patológicas fossem verificadas, senão excepcionalmente. Neste caso, provavelmente por condições muito especiais de certos pintos (ou devido a uma doença intercorrente), foram observados animais doentes depois da inoculação intracerebral, e mesmo alguns sucumbiram com sintomas de encefalite. Retirado o cérebro de tais pintos, observamos um processo de encefalite pouco intenso, incapaz de justificar a sintomatologia apresentada. E' provavel que após inoculação intracerebral de virus haja em muitos pintos um processo ligeiro de encefalite que facilmente regride. Mesmo provocando em pintos um estado carencial, que dificultaria todas as defesas naturais e, ademais, prepararia o terreno nervoso para uma infecção, não conseguimos provocar a morte por encefalite. Este foi o caso da hipovitaminose B experimental, em que, apesar de trabalharmos com número relativamente pequeno de animais, não obtivemos resultados que eram de esperar; é possivel que, com este processo e com número elevado de pintos inoculados com doses grandes de virus, se consiga matá-los com encefalite amarílica. Assim, os pintos que

morreram apresentando, dias após a inoculação, paralisia, são casos esporádicos, devido a uma susceptibilidade especial, ou talvez a outra doença intercorrente.

A questão mais importante de nossas investigações é a que trata da circulação e multiplicação de virus após a inoculação intracerebral, intraperiotoneal e intradérmica. Esta última tem importância primordial, porque é quase idêntica à maneira natural da infecção e, devido a pequena quantidade de virus que inoculamos, mais ou menos equivalente à picada de um mosquito, podemos formular a hipótese de que tais animais possam servir de depositários de virus, e talvez muitas outras aves ainda não estudadas, contribuindo para a disseminação da febre amarela silvestre. A idade, pelo menos em pintos, é o fator mais importante no problema da circulação do virus. De um modo geral, podemos dizer que a presença do virus no sangue, varia na razão inversa da idade, isto é, quanto mais velho é o pinto, tanto menor a possibilidade de obtermos virus circulante, sendo que dificilmente poderá ser evidenciado em animais com mais de 10 dias, salvo se a quantidade administrada for muito grande; neste caso, o virus isolado do sangue é, muito provavelmente, resultante da eliminação e não o significado de uma multiplicação. A difusão do virus no organismo é feita por via circulatória, sendo possivel nos primeiros dias post-inoculação, evidenciar virus em diversos orgãos. Parece não ter significação especial o encontro de pequena quantidade de virus em certos orgãos, sem que no mesmo dia tenha sido isolado do sangue; o fato importante, e que demonstra a afinidade especial do virus para o tecido nervoso, é não ser possivel isolar virus do cérebro nos primeiros dias que seguem à inoculação extraneural, e, mais tarde, o desaparecimento dele do sangue e dos diversos orgãos, sendo apenas encontrado no cérebro (e provavelmente em todo sistema nervoso central), por vários dias.

O desenvolvimento da imunidade verifica-se em grande número de pintos inoculados por via intracerebral, intraperitoneal e intradérmica, mesmo quando pequenas quantidades de virus são introduzidas, devido à multiplicação no organismo. O aparecimento de anticorpos no sangue, em quantidade suficiente para neutralizar o virus nas provas de proteção, se processa rapidamente, em média 10 dias após a inoculação, não obstante haver ainda virus no cérebro.

A idade tem grande influência para o desenvolvimento da imunidade de pintos inoculados por via extraneural, provavelmente devido ao melhor desenvolvimento da barreira hematoencefálica, ou talvez por ser a absorção mais lenta, assim como maior a capacidade do sangue em destruir o virus. De qualquer modo, não nos foi possivel imunizar pintos com mais de 15 dias

de idade, inoculados por via intraperitoneal, ao passo que, por inoculação intracerebral obtivemos resultados positivos em animais de 35 dias.

*SUMÁRIO E CONCLUSÕES*

1. O virus neurotrópico Francês pode ser transferido em série de cérebro de pinto, sem modificações essenciais no comportamento do virus em camondongos e pintos.
2. Pintos são suscetiveis à inoculação de virus por via intracerebral, intraperitoneal e intradérmica, evidenciando virus circulante e desenvolvimento de imunidade, em alta percentagem, para os inoculados nos primeiros dias de nascidos. A presença, porem, de virus no sangue varia na razão inversa da idade. Não parece ser possivel infetar pintos por via gástrica.
3. O virus pode ser encontrado, ocasionalmente, no pulmão, fígado, baço e rim; alguns dias depois é apenas isolado do cérebro, onde pode ser evidenciado até o 10.º dia post-inoculação intraperitoneal e até o 15.º dia depois de inoculação intracerebral, e talvez em data posterior. Não conseguimos, porem, isolar virus das feses.
4. Não parece haver difereça na suscetibilidade ao virus amarílico, em pintos com avitaminose B.
5. Anticorpos são evidenciaveis no soro em média 10 a 11 dias após inoculação intraperitoneal e intracerebral, sendo possivel isolar ao mesmo tempo, virus do cérebro.
6. A idade tem influência nítida no desenvolvimento da imunidade, em pintos inoculados por via intraperitoneal.
7. A multiplicação e circulação de virus após inoculação intradérmica de 50 a 160 D. M. M., torna possivel a hipótese de mosquitos infectados difundirem o virus entre pintos e talvez a outras aves, com poucos dias de idade.

*SUMMARY AND CONCLUSIONS*

1. After 80 serial passages from brain to brain of chicks, neurotropic virus fails to show essential modifications in the behaviour of the virus in mice or chicks.
2. Chicks are susceptible by intracerebral, intraperitoneal and intradermal route, showing high levels of circulating virus and become immunes when inoculated during the first days after birth. But, circulating virus varies, however, in inverse ratio to age. It does not seem possible to infect chicks by gastric route.

3. During first days virus may be found, occasionally in the lungs, liver, spleen and kidneys; some days afterwards, no chicks showed virus in other organs than brain, in which virus persists up to 10th day post-intraperitoneal inoculation and up to 15th day after the intracerebral inoculation, and perhaps till later. We have however, not been able to isolate the virus from excretions.
4. There does not seem to be any difference in susceptibillity to the yellow fever virus, on chicks with B avitaminosis.
5. Detectable immune bodies appear by 10-11 day after intraperitoneal and intracerebral inoculation, at time, that many of some chicks still have virus in the brain.
6. Age has a marked influence on the development of immunity, in chicks inoculated by intraperitoneal route.
7. The multiplication and circulation of virus after intradermal inoculation of 50 to 160 M.L.D., renders possible to suggest that infected mosquitoes can difuse the virus among chicks and, perhaps, to other birds, a few days old.

IMPRENSA NACIONAL
RIO DE JANEIRO — 1943